

JULIANA GOULART LORENZ

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EMULSIFICAÇÃO E SPRAY DRYING NA
MICROENCAPSULAÇÃO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* (LA-5) E
APLICAÇÃO EM SORVETE**

FLORIANÓPOLIS

2009

JULIANA GOULART LORENZ

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EMULSIFICAÇÃO E SPRAY DRYING NA
MICROENCAPSULAÇÃO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* (LA-5) E
APLICAÇÃO EM SORVETE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna

FLORIANÓPOLIS

2009

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EMULSIFICAÇÃO E SPRAY DRYING NA
MICROENCAPSULAÇÃO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* (LA-5) E APLICAÇÃO
EM SORVETE

Por

Juliana Goulart Lorenz

Dissertação aprovada como requisito final para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, pela comissão formada por:

Presidente:

Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna (UFSC)

Membro:

Prof^ª. Dr^ª. Eliana Badiale Furlong (FURG)

Membro:

Prof^ª. Dr^ª. Léa Luzia Freitas Costa (LACEN)

Membro:

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto (UFSC)

Coordenadora:

Prof^ª. Dr^ª. Renata Dias de Mello Castanho Amboni

Florianópolis,
2009.

*Dedico esta dissertação
a meus pais, Paulo e Ana, pelo amor
e incentivo na busca de mais este sonho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder-me força para vencer todos os obstáculos da vida.

A minha família, grandes responsáveis pelas minhas conquistas, pelo apoio e incentivo.

Ao Marcelo, pelo amor, carinho e paciência.

Ao Prof. Ernani, pelo empenho como orientador, pelas sugestões e por toda compreensão durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Alimentar, em especial a Fabiane, Regina, Carol, Maiara e Andréia, pela amizade e contribuição, principalmente durante as várias noites de trabalho no laboratório.

Aos professores Eliana Badiale Furlong, Léa Luzia Freitas Costa e Pedro Luiz Manique Barreto, membros da banca, pela colaboração fundamental.

A Prof^a. Eliana, pela grande amizade e pelo aceite imediato em contribuir para este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação, ao Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, à Universidade Federal de Santa Catarina.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A empresa Amoratto Sorvetes Artesanais e a empresária Rejane Zanotta.

Aos demais amigos e a todos aqueles que torceram e de alguma forma participaram desta caminhada.

Muito Obrigada!

LORENZ, Juliana Goulart. Comparação dos métodos de emulsificação e spray drying na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e aplicação em sorvete. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

RESUMO

Em uma primeira etapa do trabalho foi comparado o efeito de duas técnicas de microencapsulação na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) durante a estocagem em baixa temperatura e sob condições gastrointestinais simuladas. Para isso a bactéria probiótica foi microencapsulada em gel de alginato por emulsificação e por spray drying. As diferentes microcápsulas foram submetidas à análise de microestrutura e a testes de sobrevivência em -18 ± 2 °C, em pHs ácidos (pH 1,0, 2,0 e 3,0) e em sais de bile (0,5 % e 1,0 %). Tanto a microencapsulação por emulsificação como a microencapsulação por spray drying, foram eficientes para a proteção da bactéria probiótica contra possíveis danos causados pela estocagem em baixa temperatura. Entretanto, a técnica de emulsificação produziu microcápsulas menos resistentes às condições de pH ácido e sais de bile do que o spray drying. Considerando estes resultados, em uma segunda etapa do trabalho dois sorvetes foram elaborados, um contendo a bactéria probiótica livre (não encapsulada) e o outro contendo a bactéria probiótica microencapsulada por spray drying. Foi avaliada a influencia da microencapsulação na viabilidade da bactéria probiótica adicionada no sorvete e nas características físico-químicas e aceitabilidade sensorial do produto. A microencapsulação melhorou significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade da bactéria probiótica durante 12 semanas de estocagem dos sorvetes. O conteúdo de células livres diminuiu 0,35 ciclos log após as 12 semanas, enquanto que o conteúdo de células microencapsuladas diminuiu 0,27 ciclos log. Quanto às características físico-químicas, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de umidade, lipídios, proteínas, carboidratos totais, acidez e pH dos sorvetes. Porém a microencapsulação não influenciou a aceitabilidade sensorial do produto, sendo que ambos os sorvetes foram sensorialmente aceitos pelos julgadores. Os sorvetes foram considerados bons veículos para a ingestão de probióticos, pois apresentaram contagem de células viáveis superior a 10^6 UFC/mL durante todo o período de estudo.

Palavras-chave: Probiótico. Microencapsulação. Emulsificação. Spray drying. Sorvete. Físico-química. Aceitabilidade sensorial.

LORENZ, Juliana Goulart. Comparison of the emulsification methods and spray drying in the microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* (La-5) and application in ice cream. 2009. Dissertation (Master on Food Science). Federal University of Santa Catarina, Florianópolis - SC.

ABSTRACT

In a first stage of the work the effect of two microencapsulation techniques was compared in the viability of *Lactobacillus acidophilus* (La-5) during the storage in low temperature and under simulated gastrointestinal conditions. For that the probiotic bacteria was microencapsulated in alginate gel for emulsification and for spray drying. The different microcapsules were submitted to the microstructure analysis and to survival test in -18 ± 2 °C, in acid pHs (pH 1.0, 2.0 and 3.0) and in bile salts (0.5% and 1.0%). Both the microencapsulation for emulsification and the microencapsulation for spray drying were efficient for the protection of the probiotic bacteria against possible damages caused by the storage in low temperature. However, the emulsification technique produced less resistant microcapsules to the conditions of acid pH and bile salts than the spray drying. Considering these results, in a second stage of the work two ice creams were elaborated, one containing the free probiotic bacteria (non-encapsulated) and the other containing the microencapsulated probiotic bacteria for spray drying. It was evaluated the influence of the microencapsulation in the viability of the probiotic bacteria added in the ice cream and in the physico-chemical characteristics and sensorial acceptability of the product. The microencapsulation improved significantly ($p < 0.05$) the viability of the probiotic bacteria during 12 weeks of storage of the ice creams. The content of free cells reduced 0.35 cycles log after the 12 weeks, while the content of microencapsulated cells reduced 0.27 cycles log. As for the physico-chemical characteristics, there was significant difference ($p < 0.05$) among the humidity values, lipids, proteins, total carbohydrates, acidity and pH of the ice creams. However the microencapsulation didn't influence the sensorial acceptability of the product, and both ice creams were sensorially accepted by the judges. The ice creams were considered good vehicles for the probiotics ingestion, because they presented superior counting of viable cells to 10^6 UFC / g during the whole study period.

Keywords: Probiotics. Microencapsulation. Emulsification. Spray drying. Ice cream. Physico-chemical. Sensorial acceptability.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Métodos de imobilização de células. 22
- Figura 2 Estrutura química do alginato (G é o grupo ácido gulurônico, M é o grupo ácido manurônico). 26
- Figura 3 Modelo “caixa de ovo” para formação de gel de alginato com íons cálcio. 26

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Micrografias das cápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* (La-5) (A) e (B) microencapsulado pela técnica de emulsificação; e (C) e (D) microencapsulado pela técnica de spray drying. 49
- Figura 2 Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) livre, microencapsulado por emulsificação e microencapsulado por spray drying, durante estocagem a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$. 50
- Figura 3 Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) (o) livre, (●) microencapsulado por emulsificação e (●) microencapsulado por spray drying em (A) pH 6,5 (controle), (B) pH 3,0, (C) pH 2,0 e (D) pH 1,0. 52

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) (o) livre e (●) microencapsulado, durante a estocagem dos sorvetes a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$. 66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Produção e consumo de sorvete no Brasil entre os anos de 2000 e 2008.	16
----------	---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Sobrevivência de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , livre e microencapsulado (\log_{10} UFC/mL), durante 6 h de incubação em solução de sais de bile.	53
----------	--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Caracterização físico-química dos sorvetes probióticos	67
----------	--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1 O sorvete	15
2 Probióticos	19
3 Tecnologia de imobilização	21
4 Alginato de sódio	25
5 Análise de microestrutura	27
6 Análise Sensorial	28
Referências bibliográficas	30
CAPÍTULO 2 - SOBREVIVÊNCIA DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> (LA-5), MICROENCAPSULADO POR EMULSIFICAÇÃO OU POR SPRAY DRYING, DURANTE A ESTOCAGEM E SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS	41
Resumo	42
Abstract	42
1 Introdução	43
2 Materiais e Métodos	44
2.1 Preparação da cultura	44
2.2 Microencapsulação	45
2.3 Estocagem das células livres e microencapsuladas	46
2.4 Análise de microestrutura	46
2.5 Sobrevivência das células livre e microencapsuladas em níveis de pH similares aos do estômago humano	47
2.6 Sobrevivência das células livres e microencapsuladas aos sais de bile	47
2.7 Enumeração de células viáveis	47
2.8 Análise estatística	48
3 Resultados e Discussão	48
3.1 Análise de microestrutura	48
3.2 Sobrevivência das células livres e microencapsuladas durante a estocagem	49
3.3 Sobrevivência das células livre e microencapsuladas em níveis de pH similares aos do estômago humano	51

3.4 Sobrevivência das células livres e microencapsuladas aos sais de bile	52
Referências bibliográficas	54
CAPÍTULO 3 - INFLUÊNCIA DA MICROENCAPSULAÇÃO NA VIABILIDADE DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> (LA-5) E NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS DE SORVETE	58
Resumo	59
Abstract	59
1. Introdução	60
2. Materiais e Métodos	61
2.1 Preparação da cultura	61
2.2 Microencapsulação da bactéria probiótica	62
2.3 Elaboração dos sorvetes probióticos	62
2.4 Enumeração de células viáveis	63
2.5 Análise físico-química	64
2.6 Análise sensorial	64
2.7 Análise estatística	64
2.8 Análise de custo	65
3. Resultados e Discussão	65
3.1 Sobrevivência da bactéria probiótica livre e microencapsulada durante a estocagem dos sorvetes	65
3.2 Características físico-químicas	67
3.3 Avaliação sensorial	67
3.4 Custo da adição da bactéria probiótica livre ou microencapsulada no sorvete	68
Referências bibliográficas	70
CONCLUSÕES	74
ANEXOS	75
ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC	76
ANEXO B – Ficha para avaliação sensorial dos testes de aceitabilidade global e intenção de compra	78

INTRODUÇÃO

Consumidores modernos estão cada vez mais preocupados com a saúde e almejam o consumo de alimentos saudáveis ou capazes de prevenir doenças (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Neste contexto, destacam-se os alimentos funcionais, que além de fornecerem a nutrição básica, possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos pela nutrição convencional (SANDERS, 1998). Suas propriedades benéficas são resultado da ação de componentes biologicamente ativos como alimentos sulfurados e nitrogenados, pigmentos e vitaminas, compostos fenólicos, prebióticos, ácidos graxos poliinsaturados, fibras e probióticos (MORAES; COLLA, 2006).

Segundo Reig e Anesto (2002) os probióticos são microrganismos vivos que podem ser agregados como suplementos na dieta, afetando de forma benéfica o desenvolvimento e melhora da microbiota intestinal. Nos países desenvolvidos é crescente a popularidade dos alimentos funcionais contendo probióticos e isto se deve aos avanços nas pesquisas em desenvolvimento de novos produtos, que resultaram na incorporação de probióticos não só em produtos lácteos, mas também em bebidas, cereais e até mesmo em produtos cárneos (MATTILA-SANDHOLM, 2002). No entanto, a viabilidade e a estabilidade destes microrganismos tem sido um desafio tecnológico. Segundo Hamilton-Miller, et al.(1999) e Kailasapathy e Rybka (1997), as culturas probióticas podem não sobreviver em número suficientemente alto quando submetidas a determinadas condições, como por exemplo, o armazenamento em baixas temperaturas e a passagem pelo trato gastrointestinal humano. Para tentar minimizar este tipo de problema pode-se empregar o uso de probióticos liofilizados e/ou microencapsulados (SANDHOLM et al., 2002; SHAH et al., 1995).

A técnica de microencapsulação é, de modo geral, definida como o processo de revestimento de partículas muito pequenas possibilitando a utilização destas em ampla variedade de formas e produtos. Na área alimentícia tem sido uma alternativa viável para resolver os problemas de instabilidade e inviabilidade de probióticos, além de possibilitar novas aplicações (CUI et al., 2000; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; O'RIORDAN et al., 2001; SULTANA et al., 2000).

Vários materiais encapsulantes e metodologias têm sido utilizadas com sucesso no processo de microencapsulação, ou seja, no revestimento de bactérias. Entretanto, o alginato de cálcio é um dos encapsulantes mais indicados na imobilização de bactérias ácido lácticas,

devido principalmente a sua facilidade de manuseio, sua natureza não-tóxica e seu baixo custo (SULTANA et al., 2000).

A Associação Brasileira das Indústrias de Sorvetes (ABIS) estimou uma produção de 691 milhões de litros de sorvete no final de 2008, correspondendo a um aumento de 10 % sobre a produção obtida no ano de 2007 (ABIS, 2008). Além de ser um produto de baixo custo, de fácil fabricação e poder ser apresentado em uma grande variedade de formas, texturas e sabores (GRANGER et al., 2005), o sorvete possui alto valor nutricional e representa uma excelente fonte de energia.

A elaboração de um produto inovador, nutritivo e funcional, viria a contribuir ainda mais para o consumo de derivados lácteos como o sorvete. Segundo Alamprese et al. (2002), o sorvete serviria como uma alternativa apropriada para a presença de bactérias probióticas em uma dieta alimentar saudável. Para tanto, deve-se levar em consideração que o cuidado na produção de um sorvete probiótico deverá estar associado à viabilidade da cultura e na relação desta com as condições de produção e armazenamento estabelecidas.

O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito de dois métodos de microencapsulação, emulsificação e spray drying, na sobrevivência da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e sua aplicação em sorvetes.

O trabalho será apresentado na forma de artigos divididos nos seguintes capítulos:

- (a) **Capítulo 1** – Embasamento bibliográfico abordando os principais temas envolvidos no trabalho: sorvete, probióticos, tecnologia de imobilização, microencapsulação, análise de microestrutura, análise sensorial.
- (b) **Capítulo 2** - Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* (La-5), microencapsulado por emulsificação ou por spray drying, durante a estocagem e sob condições gastrointestinais simuladas, cujo objetivo foi comparar o efeito de duas técnicas de microencapsulação na viabilidade da bactéria probiótica exposta a temperatura de congelamento, pH ácido e sais de bile.
- (c) **Capítulo 3** – Influência da microencapsulação na viabilidade *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e nas propriedades físico-químicas e sensoriais de sorvete, cujo objetivo foi avaliar a viabilidade da bactéria probiótica adicionada em sorvete na forma livre ou microencapsulada, e determinar as características físico-químicas e a aceitabilidade sensorial do produto.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 O sorvete

O sorvete e outros produtos similares gelados surgiram a partir da mistura de gelo e mel (ROTHWELL, 1990). Varnam e Sutherland (1994) descrevem que a criação de sobremesas geladas iniciou-se na China, através da mistura de neve, frutas e suco de frutas. Na Europa tais sobremesas foram introduzidas no final do século XIII, mas durante 500 anos somente a aristocracia foi beneficiada com essa iguaria.

Em 1851 iniciou-se a produção de sorvete em grande escala, expandindo rapidamente a indústria pela introdução da refrigeração mecânica e o desenvolvimento das máquinas produtoras de sorvete, como o homogeneizador em 1899 e o congelamento contínuo em 1929 (ROTHWELL, 1990; VARNAM; SUTHERLAND, 1994). Atualmente o sorvete é produzido em trocador de calor de superfície raspada, onde o ar é disperso através da mistura pelas lâminas do trocador e mantido sob congelamento (WILDEMOSER et al., 2004). Desde sua invenção, vêm-se agregando ao sorvete novos sabores, texturas, formas e processos tecnológicos de fabricação (GRANGER et al., 2005).

No Brasil, o consumo do sorvete ainda é baixo em relação aos países europeus, em torno de 5 litros por pessoa por ano, principalmente em épocas de calor (Tabela 1). No entanto, os países nórdicos como Finlândia, Dinamarca e Noruega alcançam valores de 20 litros por ano por pessoa (WEISBERG, 2005). Na Nova Zelândia, o consumo anual per capita de sorvete chega a 26 litros (ABIS, 2008).

Segundo a legislação brasileira, sorvete é definido como gelado comestível, ou seja, produto alimentício obtido a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e substâncias, ou de uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, em condições tais que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumo. A legislação brasileira determina que o sorvete contenha, no mínimo, 2,5 % de gordura e 2,5 % de proteína, sendo estes de origem láctea ou parcialmente substituídos por produtos não lácteos. Outros ingredientes, como frutas ou pedaços de frutas, açúcares, produtos de cacau e/ou outras substâncias alimentícias, podem ser adicionados também, desde que não ocorra descaracterização do produto (BRASIL, 1999).

Tabela 1. Produção e consumo de sorvete no Brasil entre os anos de 2000 e 2008.

EM MILHÕES DE LITROS									
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Produção	480	491	527	502	515	530	552	648	691
Consumo	645	662	713	685	705	724	760	897	954
Consumo per capita	3,77	3,81	4,04	3,82	3,88	3,93	4,07	4,74	4,98
EM US\$ MILHÕES									
Faturamento	1294	1042	890	1056	1148	1186	1226	1295	1378
Exportação	2,9	4,3	1,1	0,9	0,9	0,6	0,8	0,8	1,0
Importação	3,0	2,1	2,6	0,7	1,3	2,6	3,3	4,0	6,0

Fonte: ABIS (2008).

A composição do sorvete é bastante variada e sua estrutura complexa, sendo possível produzir diversos tipos de sorvetes a partir da combinação dos ingredientes em diferentes proporções (ARBUCKLE, 1986). O principal ingrediente do sorvete é o leite em todas as formas, representando 60 % da mistura. Seguem-se em ordem de importância quantitativa, os açúcares (12 a 17 %), as gorduras (10 a 17 %), as proteínas (8 a 12 % em extrato seco desengordurado), os estabilizantes e emulsificantes (0,2 a 0,5 %), além de outros ingredientes (ORDÓÑEZ et al., 2005; SZCZESNIAK, 2000; TRGO, 2003).

Sendo o leite o principal ingrediente do sorvete, é basicamente a sua composição química que fornece ao sorvete as suas características essenciais. A gordura do leite, por exemplo, influencia nas características sensoriais (CENZANO; MADRID, 1995), enquanto as proteínas interagem com a superfície da gordura, atuando como agentes emulsificantes (ROBINSON, 1987). O leite é composto por três grandes classes de proteínas que são as caseínas, que representam 80 % das proteínas totais do leite; as proteínas do soro, que correspondem a 20 % das proteínas totais e as proteínas associadas à fase lipídica (componentes da membrana dos glóbulos de gordura do leite) (ANTUNES, 2003 apud OLIVEIRA, 2004). A caseína e as proteínas do soro têm importâncias diferenciadas, pois enquanto a caseína retém aproximadamente 3 g de água/g de proteína, a proteína do soro retém somente 1 g de água/g de proteína (EARLY, 2000). Entretanto, com o tratamento térmico ocorre o aumento da capacidade de retenção da água, fazendo com que a proteína do

soro retenha quantidades próximas à da caseína (AMIOT, 1991). A retenção da água é importante no caso do sorvete, pois, quanto menor a quantidade de água livre no produto, menor será a quantidade e o tamanho dos cristais de gelo formados (BORSZCZ, 2002).

No sorvete, quando empregado leite com excesso de lactose observam-se alterações na textura. A 25 °C, por exemplo, apenas 17,8 g de lactose são solúveis em 100 g de solução, e em determinadas condições tal substância pode formar grandes cristais ($> 15 \mu\text{m}$), conferindo ao produto uma textura “arenosa” (ROBINSON, 1987; AMIOT, 1991). A cristalização da lactose pode ocorrer durante o armazenamento do produto e depende da quantidade de sólidos da mistura, da temperatura de armazenamento e da presença de estabilizadores (COELHO; ROCHA, 2005). O leite em pó, principalmente o leite em pó desnatado, é rico em lactose, portanto, seu uso nesse tipo de produto deve ser limitado para evitar os efeitos indesejáveis da cristalização (BORSZCZ, 2002).

O açúcar, incorporado à mistura de ingredientes na fabricação do sorvete, além de ser responsável pelo sabor, contribui para o aumento da viscosidade e diminuição do ponto de congelamento do produto (ORDÓÑEZ et al., 2005). No entanto, seu uso em excesso pode conferir sabor demasiadamente doce e textura “arenosa”, além de interferir na propriedade de endurecimento do sorvete (BORSZCZ, 2002; CENZANO; MADRID, 1995). Dos açúcares a serem empregados no sorvete, a sacarose é o mais utilizado, chegando a representar 80 % do total de açúcares da mistura (CENZANO; MADRID, 1995). Outros tipos de açúcares como a glicose, a lactose e a frutose também podem ser empregados em substituição ou em combinação a sacarose (COELHO; ROCHA, 2005).

Um sorvete de qualidade deve possuir em torno de 6 % de gordura, que pode ser tanto de origem animal, proveniente do leite integral e/ou derivados; como de origem vegetal, gorduras vegetais hidrogenadas (MOSQUIM, 1999). A gordura confere cremosidade, sabor e textura suave, dando corpo ao sorvete, mediante as estruturas dos grânulos de gordura (ORDÓÑEZ et al., 2005). Sorvetes com alto teor de gordura apresentam diminuição da sensação de frio, maior maciez e cremosidade (COELHO; ROCHA, 2005), pois esta ajuda a obstruir a formação de grandes cristais de gelo, evitando a sensação de “arenosidade” ao consumi-lo (LLUNCH et al., 2003; ORDÓÑEZ et al., 2005; SZCZESNIAK, 2000).

O conteúdo de proteínas do sorvete é geralmente cerca de 4 %, porém quanto maiores os teores protéicos melhor palatabilidade, menor ponto de congelamento, maior viscosidade e maior estabilidade (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Os estabilizantes são definidos como ingredientes que de alguma maneira contribuem para o aumento da estabilidade da emulsão, sendo indispensáveis para a manutenção da viscosidade, a diminuição da velocidade de derretimento e o aumento da capacidade de incorporação de ar (CENZANO; MADRID, 1995; DE OLIVEIRA et al., 2005). Bolliger et al. (2000) afirmam que os estabilizantes contribuem para a proteção do sorvete contra a recristalização da água no processo de fabricação e armazenamento, em virtude do aumento da viscoelasticidade causado pelo acréscimo da concentração dos polissacarídeos na fase não congelada do sorvete. Os estabilizantes comumente empregados em sorvetes são a goma guar, goma xantana, goma arábica e o alginato sódico (CASTRO, 2003).

Os emulsificantes são utilizados no sorvete para melhorar o batimento e produzir maior uniformidade, facilitando a incorporação de ar, o chamado overrun, e resultando numa massa com textura macia e suave. Em sorvetes, além do overrun, pode ser avaliado também o meltdown test, ou seja, o teste de derretimento do sorvete, que também é influenciado pelo tipo de emulsificante utilizado (GOFF, 2005). O uso de emulsificantes contribui também para uma maior firmeza e resistência ao derretimento (GOFF, 1997). Os emulsificantes mais utilizados industrialmente são as proteínas, os tensoativos de baixa massa molar, os fosfolipídios, além de mono e diglicerídios e ésteres de sorbitano (GOFF, 1997; RAYMUNDO, 2003).

Além dos ingredientes, a obtenção do sorvete envolve etapas de processamento, como por exemplo, a mistura, a pasteurização, a homogeneização, a maturação, a incorporação de ar, o congelamento, o envase e o armazenamento. Após a mistura dos ingredientes do sorvete realiza-se a pasteurização que apresenta também a função de produzir a fusão e a ativação dos emulsificantes e estabilizantes, respectivamente. Com a pasteurização observa-se a desnaturação das proteínas, causando a redução da tensão superficial existente entre a gordura e a água e o aumento da capacidade de retenção de água (BORSZCZ, 2002). A etapa de homogeneização, empregada para evitar a separação de fases em sorvetes, depende de fatores como temperatura, pressão e teor de gordura (CENZANO; MADRID, 1995). O uso de gorduras vegetais hidrogenadas implica numa homogeneização a quente, de modo a liquefazê-las e facilitar a mistura (CORREIA et al., 2007).

Na fase de maturação, etapa posterior à pasteurização, acontece a adição de polpas de frutas, saborizantes, emulsificante e acidulante, pois estes são sensíveis ao tratamento térmico. Nesta fase ocorre também a solidificação das gorduras e o aumento da viscosidade, devido à hidratação das proteínas do leite e estabilizantes, que absorvem a água livre. Misturas que não

passam pela maturação tendem a apresentar problemas durante o batimento, resultando geralmente num produto final de qualidade inferior (EARLY, 2000; GOFF, 1997; MOSQUIM, 1999).

Na elaboração do sorvete o ar pode ser incorporado na mistura, através de batimento ou por injeção, juntamente com a etapa de congelamento. Enquanto a mistura é agitada para a incorporação de ar, ocorre a formação de cristais de gelo e de uma fase não-congelada. À medida que a água passa para o estado sólido, os açúcares dissolvidos, lactose, proteínas do leite, sais e hidrocolóides são concentrados (SOFJAN; HARTEL, 2004; CORREIA et al., 2007).

Assim, pode-se afirmar que o sorvete é estruturalmente tanto uma emulsão quanto uma espuma, na qual o ar incorporado é recoberto por cristais de gelo, glóbulos de gordura individualizados ou parcialmente fundidos, além de cristais de lactose (GOFF, 1997; ORDÓÑEZ et al., 2005).

2 Probióticos

Fuller (1989) definiu probióticos como sendo suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afetam benéficamente o hospedeiro, promovendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal. Recentemente a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) se referiram aos probióticos como microrganismos vivos (bactérias ou leveduras), que quando ingeridos ou aplicados em número suficiente conferem um ou mais benefícios específicos à saúde do consumidor (ANAL; SINGH, 2007; SANDERS, 2003).

O modo de ação dos probióticos não foi ainda completamente elucidado, embora vários processos tenham sido sugeridos. Um deles é a “exclusão competitiva”, em que o probiótico competiria com os patógenos por sítios de fixação (HAVENAAR et al., 1992), por nutrientes e/ou através da produção de compostos antimicrobianos, impedindo sua ação transitoriamente. A “exclusão competitiva” explicaria a necessidade da administração continuada do alimento a fim de conferir seus efeitos benéficos (GUARNER; MALAGELADA, 2003; KAUR et al., 2002). Os probióticos podem também afetar patógenos através da síntese de bacteriocinas (NAIDU et al., 1999; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002;

RODRIGUEZ, 1996; VILLANI et al., 1995), de ácidos orgânicos voláteis (AUDISIO et al., 2000; JIN et al., 2000; OGAWA et al., 2001) e de peróxido de hidrogênio (HAVENAAR; HUIS IN'T VELD, 1992; NAIDU et al., 1999), ou atuar sobre o metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo (KOZASA, 1986) e liberando enzimas como a lactase (DE VRESE et al., 2001).

Atualmente, o interesse pela adição de microrganismos probióticos em vários alimentos vêm crescendo como forma de aumentar seus valores nutricionais e terapêuticos (O'SULLIVAN, 2001). Vários derivados lácteos probióticos estão disponíveis e sendo lançados no mercado (STANTON et al., 2003). Resultados positivos em pesquisas com probióticos estimulam a fabricação de leites fermentados, iogurtes, sobremesas a base de leite, leite em pó destinado a recém nascidos, sorvetes (MAGARIÑOS et al., 2007), salsichas (MUTHUKUMARASAMY; HOLLEY, 2006) e diversos tipos de queijos, além de produtos em forma de cápsulas ou em pó para serem diluídos em bebidas frias, alimentos de origem vegetal fermentados e maionese (DAVIDSON et al., 2000; GARDINER et al., 1999; INGHAM, 1999; OLIVEIRA et al., 2002; STANTON et al., 1998; STANTON et al., 2003).

Diversos microrganismos podem ser usados como probióticos, entre eles principalmente os dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. O *Lactobacillus acidophilus* constitui a espécie mais comumente empregada em derivados lácteos e seus benefícios à saúde incluem, dentre outros, a redução dos sintomas de intolerância a lactose, a inibição de microrganismos patogênicos e vírus, produção de vitaminas e a redução dos níveis de colesterol. Além disso, tal microrganismo possui a particularidade de ser pouco afetado pela salinidade do meio, tolerar valores baixos de pH e ser microaeróbio, apresentando crescimento em ambientes com pouca oxigenação, o que resulta numa maior resistência e facilidade de emprego durante a fabricação e armazenamento dos alimentos quando comparado com outras culturas probióticas (SALMINEN; VON WRIGHT, 1993).

Além das propriedades já mencionadas, os probióticos devem ser inócuos, pertencerem ao gênero equivalente às bactérias de origem humana, se manter viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte, tolerar o baixo pH do suco gástrico, resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal, produzir compostos antimicrobianos, ser metabolicamente ativo no intestino (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000; STANTON et al., 2003), não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos e possuir propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas (HAVENAAR;

HUIS IN'T VELD, 1992; HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002; SAARELA et al., 2000; SALMINEN et al., 1998).

São considerados alimentos probióticos aqueles que contenham pelo menos 10^6 UFC de células viáveis/g ou mL de produto, disponíveis todo o tempo de vida-útil. Porém, vários fatores como acidificação do produto final, tipos de ácidos produzidos, o teor de oxigênio presente durante o armazenamento, os compostos antimicrobianos e a perda de nutrientes do leite podem reduzir sua viabilidade e, conseqüentemente, prejudicar suas propriedades probióticas. Para se tentar minimizar este tipo de problema pode-se citar o uso do probiótico liofilizado, a utilização dos métodos de microencapsulação ou ainda da tecnologia da Engenharia Genética, através do desenvolvimento de linhagens mais específicas a determinadas condições (SANDHOLM et al., 2002; SHAH et al., 1995).

Enfim, bactérias probióticas com boas propriedades tecnológicas para a fabricação de produtos alimentícios devem apresentar multiplicação no leite em número suficiente para conferir o caráter probiótico, promover propriedades sensoriais adequadas ao produto e serem estáveis durante armazenamento (OLIVEIRA et al., 2002; PICOT; LACROIX, 2003). Além disso, com relação às perspectivas de processamento de alimentos, é desejável que essas cepas sejam apropriadas para a produção industrial em larga escala, resistindo às condições de processamentos como liofilização ou secagem por atomização (STANTON et al., 2003).

3 Tecnologia de imobilização

A tecnologia de imobilização é definida como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada significativamente (CANTARELLI, 1989; CARVALHO et al., 2006). A possibilidade de uso em processos contínuos, o aumento da estabilidade e o reaproveitamento do material biológico, são considerados como as principais vantagens propiciadas pela imobilização (CARVALHO et al., 2006; VITOLO, 1988).

Segundo Ramakrishna e Prakasham (1999) o uso de sistemas com células imobilizadas tem sido qualificado como uma alternativa viável para aumentar a sua estabilidade diante de processos tecnológicos. Desta forma, as células imobilizadas seriam mais resistentes às

condições adversas, uma vez que a matriz de imobilização resultaria em maior proteção aos microrganismos (CARVALHO et al., 2006; LEE et al., 1983).

O método de imobilização e o tipo de suporte a serem empregados em um determinado processo devem ser estabelecidos empiricamente e a sua escolha dependerá, basicamente, das características peculiares do material biológico e das condições de uso do sistema imobilizado. Face à variabilidade destes fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte universal adequado para qualquer processo (VITOLO, 1988).

Baseados no mecanismo físico empregado têm-se os seguintes métodos (Figura 1): (a) de agregação das células de forma natural, por floculação, ou induzida artificialmente com agentes ligantes (cross-linking); (b) de ligação (anexação, união, adesão) ou adsorção sobre superfícies carreadoras sólidas; (c) de aprisionamento (envolvimento) no interior de matrizes porosas; e (d) o de contenção (retenção) das células em barreiras (PILKINGTON et al., 1998).

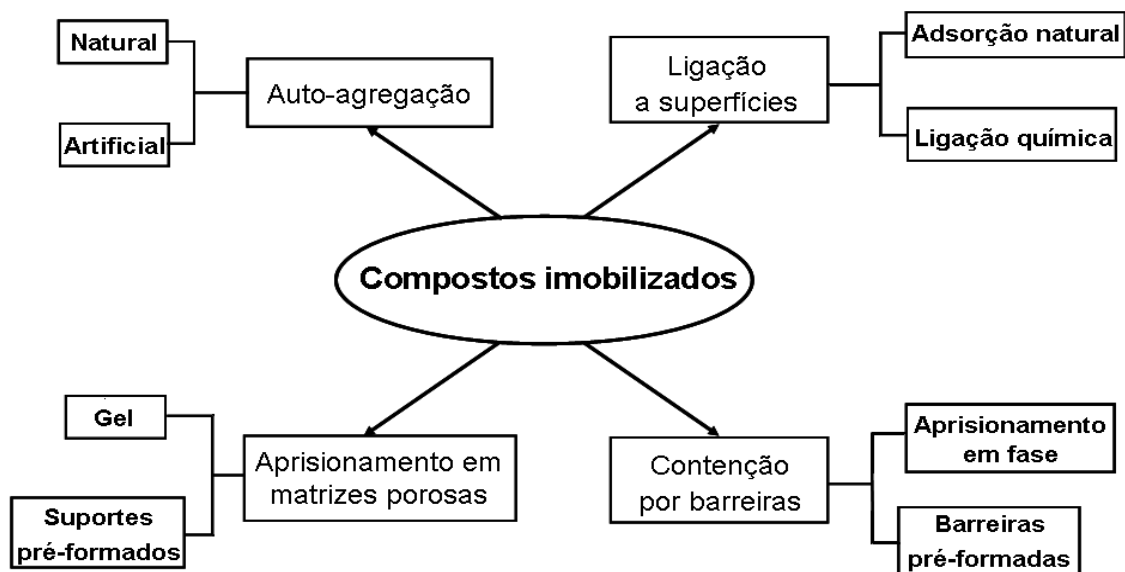


Figura 1. Métodos de imobilização de células.

Fonte: Canilha et al., (2006).

A imobilização por meio de auto-agregação, como o próprio nome referencia, envolve a agregação ou a floculação das células de maneira natural ou artificialmente induzida. Desta forma, as células são ligadas entre si sem a necessidade de uso de um suporte de imobilização. Porém, os agregados celulares naturais são geralmente instáveis e sensíveis às tensões de cisalhamento, sendo necessária à adição de agentes químicos que formam ligações cruzadas entre células durante a imobilização (CARVALHO et al., 2006).

O método de ligação às superfícies pode ser realizado a partir de interações iônicas ou adsorptivas, ou através de ligações covalentes entre grupos reativos do suporte e das células. A ligação por meio de adsorção e/ou interações iônicas é um método simples e barato, existindo a possibilidade de regenerar a matriz utilizada, porém, apresenta como desvantagem a vulnerabilidade de perda das células imobilizadas para o meio reacional, impedindo o trabalho em condições muito severas (GROBOILLOT et al., 1994; PRADELLA, 2001).

A imobilização por meio de aprisionamento em matrizes porosas, normalmente envolve a sintetização in situ da matriz porosa em torno das células a serem imobilizadas. Os poros da matriz formada são menores que as células contidas no interior (PRADELLA, 2001). Este método tem sido extensivamente estudado para a imobilização de células viáveis, devido à possibilidade do uso de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suportes de imobilização (GROBOILLOT et al., 1994). Além disso, as células imobilizadas neste tipo de suporte podem ser protegidas de condições adversas de pH, temperatura, solventes orgânicos e/ou compostos inibidores (PARK; CHANG, 2000). Como principais desvantagens são citados os pequenos volumes disponíveis para a contenção das células imobilizadas, a perda de células para o meio e a instabilidade dos suportes utilizados, que limitam a utilização dos agregados por longos períodos (PARK; CHANG, 2000; PRADELLA, 2001).

A imobilização por meio de contenção em barreiras envolve a utilização de membranas pré-formadas ou a formação in situ da membrana em torno das células a serem imobilizadas (KAREL et al., 1985; CARVALHO et al., 2006). Este método de imobilização também é conhecido como microencapsulação e tem sido utilizado como uma tecnologia alternativa ao aprisionamento em matrizes porosas. Este método oferece vantagens como maior capacidade de contenção de células e prevenção da perda de células para o meio. Devido à ausência de núcleo geleificado, as limitações à transferência de massa também são reduzidas (PARK; CHANG, 2000).

3.1 Microencapsulação

A microencapsulação é uma tecnologia de revestimento de partículas sólidas, líquidas ou gasosas muito pequenas, formando cápsulas fechadas que podem liberar seu conteúdo em velocidade controlada sob influência de condições específicas (ANAL; STEVENS, 2005;

ANAL et al., 2006; KAILASAPATHY; MASONDOLE, 2005). Esta tecnologia vem sendo avaliada na obtenção de alimentos probióticos como uma forma de proteção das células viáveis aos extremos de calor e umidade (O'RIORDAN et al., 2001). Industrialmente, bactérias probióticas microencapsuladas são aplicadas em produtos lácteos fermentados, como por exemplo, iogurte, queijo, sobremesas lácteas geladas, além da produção de biomassa. A microencapsulação facilita a manufatura dos produtos lácteos fermentados nos quais as bactérias devem possuir características consistentes e alta estabilidade durante a armazenagem, além de maior produtividade (ANAL; SINGH, 2007). Nesses produtos as microcápsulas podem ser gradualmente rompidas liberando os ingredientes ativos. Uma microcápsula pode ser aberta por diferentes meios, incluindo fratura por calor, solvatação, difusão e pressão (BRANNON-PEPPAS, 1997). Contudo, as microcápsulas de bactérias probióticas também podem ser designadas para a ruptura em áreas específicas do corpo, como por exemplo, o intestino. Desta forma, um revestimento capaz de resistir às condições ácidas pode ser usado, permitindo que os ingredientes ativos consigam passar pelo estômago (ANAL et al., 2003; ANAL; STEVENS, 2005).

As microcápsulas são constituídas por uma membrana semipermeável, esférica, fina e resistente que envolve um centro sólido/líquido, com diâmetro variando desde o tamanho de 1 μm a 1 mm (ANAL; SINGH, 2007). Em um amplo sentido, a microencapsulação pode ser usada em muitas aplicações na indústria de alimentos, incluindo a estabilização do material central; controlando reações oxidativas; fornecendo prolongada ou controlada liberação (ambas temporárias e liberação com tempo-controlado); melhorando sabores, cores e odores; aumentando a vida-útil; e protegendo componentes contra perdas nutricionais (CUI et al., 2000; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; OLIVEIRA, 2006; O'RIORDAN et al. 2001; SULTANA et al., 2000). Entretanto, alguns aspectos básicos devem ser considerados no desenvolvimento de sistemas microencapsulados, tais como a natureza e a estabilidade do material a ser encapsulado; as características do polímero encapsulador; o processo de microencapsulação; e as características do produto a ser obtido (OLIVEIRA, 2006).

Diversos materiais de origem natural, semi-sintética ou biodegradável podem ser utilizados como matéria-prima na microencapsulação. Dentre estes, pode-se citar a goma arábica, o alginato, a quitosana, a carragena, carboidratos, o amido, a maltodextrina, proteínas, os derivados de celulose (carboximetil celulose – CMC, etilcelulose) e os polímeros derivados do ácido acrílico e metacrílico (JACKSON; LEE, 1991). O polímero encapsulador deve ser capaz de formar um filme coesivo com o material a ser encapsulado, ser

quimicamente compatível, não reagir com o núcleo e oferecer propriedades desejáveis de revestimento, tais como resistência, flexibilidade, impermeabilidade e estabilidade (DONBROW, 1992). Além disso, junto com a escolha do polímero deve-se levar em conta o tipo de solvente compatível com o processo. Muitos polímeros requerem a utilização de solventes orgânicos, o que impede o seu uso na encapsulação de organismos vivos. Este inconveniente tem despertado o interesse no desenvolvimento e utilização de polímeros passíveis de serem utilizados em meio aquoso, especialmente para a encapsulação de microrganismos (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002).

Das operações empregadas para a microencapsulação, a mais comumente utilizada na indústria de alimentos é a atomização ou spray drying, por ser um processo econômico e flexível, além de produzir um produto de boa qualidade de forma contínua (DZIEZAK, 1988). Entretanto, muitas bactérias probióticas não sobrevivem bem às temperaturas e pressões osmóticas extremas a que são expostas durante o processo de atomização (SELMER-OLSEN et al., 1999), sendo desta forma necessário o uso de operações, que empregam temperaturas mais amenas, como a emulsificação.

A emulsificação tem sido aplicada com sucesso na microencapsulação de bactérias ácido lácticas (LACROIX et al., 1990). Neste método as cápsulas são formadas a partir de duas etapas: a dispersão de uma fase aquosa, contendo as células bacterianas e uma suspensão polimérica, dentro de uma fase orgânica, como óleo, resultando em uma emulsão de água em óleo; e a solidificação das cápsulas por um agente geleificante. A emulsificação resulta em cápsulas de pequenos diâmetros, além de ser facilmente aplicada em grande escala (KAILASAPATHY, 2002; MORTAZAVIAN et al. 2007).

4 Alginato de sódio

O alginato de sódio é um biopolímero extraído de diferentes espécies de macroalgas, principalmente algas marrons, tais como, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystid pyrifera* (GOMBOTZ; WEE, 1998). Em termos moleculares, o alginato é um polímero linear composto de dois blocos principais formados por unidades de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) unidos por ligações glicosídicas (1,4) podendo variar

em composição e sequência, dependendo da alga de origem (Figura 2) (ZHANG; CHENG; YING, 2006).

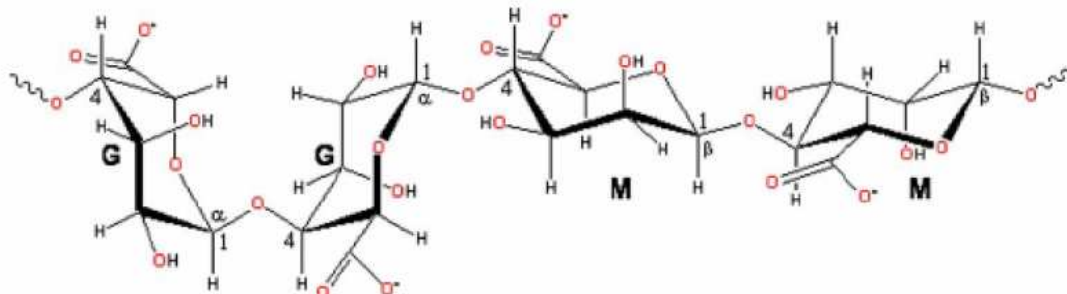


Figura 2. Estrutura química do alginato (G é o grupo ácido gulurônico, M é o grupo ácido manurônico).

Fonte: Souza Junior (2006).

Em presença de cálcio e outros íons divalentes, o alginato de sódio pode, através de um processo de ligação cruzada, trocar o íon sódio de sua estrutura por um íon divalente, geleificando o meio em que se encontra. Os cátions monovalentes e o íon Mg^{2+} não induzem a essa geleificação. Íons como Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} possuem um uso limitado por apresentarem certa toxicidade. Na maioria das vezes, essa reticulação é feita ao se trocar o íon Na^+ dos ácidos gulurônico com cátions divalentes formando uma rede 3D do tipo “caixa de ovo” (Figura 3). Os cátions divalentes se ligam aos blocos de ácidos gulurônico de uma maneira cooperativa que pode ter mais de 20 monômeros associados. Cada cadeia de alginato pode dimerizar para formar junções com muitas outras cadeias resultando em cadeias de gel (GOMBOTZ; WEE 1998). Devido a essa propriedade de geleificação, o alginato pode ser usado como matriz e assim envolver moléculas de significância biológica, tais como, enzimas, plantas, células animais e medicamentos (VALENGA, 2007).

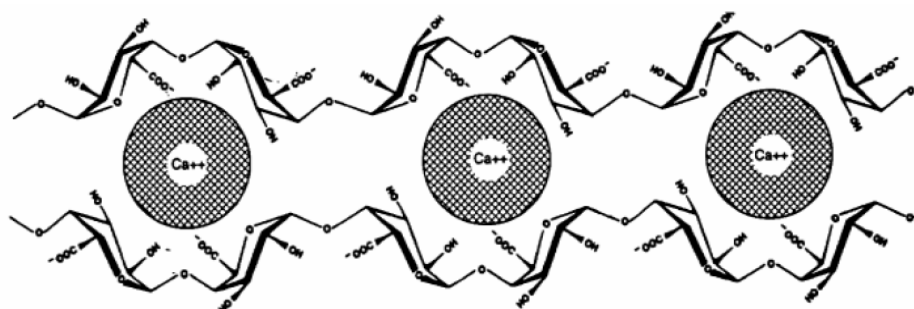


Figura 3. Modelo “caixa de ovo” para formação de gel de alginato com íons cálcio.

Fonte: Clark e Ross-Murphy (1987).

O alginato de sódio é o polímero mais utilizado na microencapsulação de células bacterianas (RAMAKRISHNA; PRAKASHAM, 1999). Como a formação do gel ocorre rapidamente na presença de íons cálcio, sem alterações drásticas de temperatura, pH e pressão osmótica, a atividade e a viabilidade dos microrganismos microencapsulados são conservadas quando empregado o alginato (CARVALHO et al., 2006). O alginato apresenta vantagens como, por exemplo, não ser tóxico; não interagir com o microrganismo; ser compatível com o cloreto de cálcio, componente indispensável à rigidez das microcápsulas; não afetar a viabilidade das bactérias encapsuladas durante sua vida-útil; e possibilitar a liberação das células imobilizadas, através da solubilização e seqüestro dos íons cálcio presentes nas cápsulas do gel. Além disso, apresenta também baixo custo, grande disponibilidade no mercado, possibilidade de emprego em escala industrial e aceitação da substância como aditivos na produção de alimentos (CHAMPAGNE et al., 2000; SHAH; RAVULA, 2000; SHEU; MARSHALL, 1991).

Testes de resistência do gel com diversos agentes geleificantes como pectato, κ -carragena, goma gelana e ágar demonstraram que alginatos formam um gel mais firme, com boa estabilidade mecânica e fácil liberação da bactéria encapsulada quando suspendida em tampão alcalino (NICETIC et al., 1999). Do mesmo modo, pesquisas referentes à microencapsulação de bactérias probióticas indicaram que a encapsulação das células com gel de alginato resulta em um aumento de 80 a 95 % na sobrevivência dos probióticos utilizados (JANKOWSKI et al., 1997; KRASAEKOOPT et al., 2003; SHEU; MARSHALL, 1991; SHEU et al., 1993).

5 Análise de microestrutura

A microscopia é um instrumento útil para monitorar o desenvolvimento e a produção de microcápsulas (ALLAN-WOJTAS et al., 2008), sendo vital para caracterizar externamente a estrutura e o arranjo molecular da amostra (JOBIN et al., 2005). Rosenberg et al. (1985) indicaram que a importância da microscopia eletrônica nos estudos de microencapsulação, seria a verificação da atuação dos revestimentos empregados, da sua funcionalidade, da massa das microcápsulas, além de outras imperfeições na matriz polimérica.

Inúmeras técnicas de microscopia podem ser utilizadas na análise de microestrutura. Porém, uma das mais rotineiramente empregadas no estudo da microencapsulação é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (NIELSEN et al., 2007). Kim et al. (2007) verificaram através da MEV que microcápsulas liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus* apresentavam tamanho 75 mm, forma esférica e superfície rugosa.

A interpretação da MEV é porém, intrinsecamente subjetiva e exige um trabalho extensivo. No entanto, esta complexibilidade é necessária para a obtenção de um método quantitativo veloz e confiável (NIELSEN et al., 2007).

6 Análise Sensorial

A análise sensorial dos alimentos constitui uma das mais importantes ferramentas para o desenvolvimento da produção na indústria alimentícia. Isso devido a sua aplicação no controle de qualidade e de processos; na formulação e desenvolvimento de novos produtos; e nas estratégias de lançamento dos mesmos no mercado (PERALTA et al., 1999).

Segundo Cardello e Cardello (1998), os testes sensoriais utilizam os órgãos dos sentidos humanos como “instrumentos” de medida e devem ser incluídos como garantia de qualidade dos alimentos, por serem uma medida multidimensional integrada. Os testes sensoriais apresentam vantagens como, por exemplo, a determinação da aceitabilidade de um produto por parte dos consumidores.

De acordo com o objetivo, ou seja, com o critério de seleção e com a tarefa específica de cada julgador, os testes sensoriais podem ser classificados em afetivos, discriminativos, descritivos e de qualidade (STONE; SIEDEL, 1995). Destes quatro tipos, os testes afetivos são os mais empregados quando se deseja conhecer a aceitabilidade de um alimento por parte do consumidor, bem como as suas preferências. Em ambos os casos se busca medir estes critérios a partir de dados obtidos de uma amostra populacional de um grupo de indivíduos, que por coincidência de preferências de consumo tendem a possuir muitas vezes “gostos”, “apetências”, “vícios” e interesses semelhantes (PERALTA et al., 1999).

Na aceitabilidade e preferência de um alimento, um dos métodos mais utilizados é o da escala hedônica, onde o julgador e/ou o consumidor avalia o produto seguindo uma escala previamente estabelecida através de atributos como “gostei” e “desgostei” (CHAVES;

SPROSSER, 2001). Morales (1994) cita que para a aplicação de um teste afetivo é necessário em primeiro lugar, determinar se é desejável somente avaliar a preferência (gostar ou desgostar), ou também a aceitabilidade do produto. Neste último caso, os questionários deverão conter não somente perguntas de preferência, mas também se o julgador deseja ou não adquirir tal produto.

Referências bibliográficas

ALLAN-WOJTAS, P., TRUELSTRUP HANSEN, L., PAULSON, A.T. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 101-108, 2008.

ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; SVANI, L. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **International Dairy Journal**, v.12, p. 201-208, 2002.

AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 547.

ANAL, A.K.; BHOPATKAR, D.; TOKURA, S.; TAMURA, H.; STEVENS, W.F. Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, p. 713–724, 2003.

ANAL, A.K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Foods Science & Technology**, v.18, n.5, p. 240-251, 2007.

ANAL, A.K.; STEVENS, W.F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 45-54, 2005.

ANAL, A.K.; STEVENS, W.F.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 166-173, 2006.

ARBUCKLE, W. S. **Ice Cream**. 14 ed. Westport: Avia Publishing Company. New York : Van Nostrand Reinhold, 1986. 483 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SORVETES - ABIS. Disponível em: <<http://www.abis.com.br>>. Acesso em: 26 e maio de 2009.

AUDISIO, M.C.; OLIVER, G.; APELLA, M.C. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella pullorum*. **Journal of Food Protection**, v.63, n.10, p.1333-1337, 2000.

BOLLIGER, S.; KORNBRUST, B., GOFF, H. D.; THARP, B. W.; WINDHAB, E. J. Influence of emulsifiers on ice cream produced by conventional freezing and low temperature extrusion processing. **International Dairy Journal**, Barking, Inglaterra, v.10, n.7, p.497-504, 2000.

BORSZCZ, V. **Implantação do sistema APPCC para sorvetes: aplicação na empresa Kimyto. 2002.** 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

BRANNON-PEPPAS, L. Polymers in controlled drug delivery. **Biomaterials**, v.11, p. 1–14, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 379, de 26 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico referente a gelados comestíveis, preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.anvisa.org.br>>. Acesso em: 07 de outubro de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 40, de 21 de março de 2001. Regulamento técnico para rotulagem nutricional obrigatória de alimentos e bebidas embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.anvisa.org.br>>. Acesso em: 01 de setembro de 2007.

CANTARELLI, C. The use of immobilized yeasts in wine fermentation. **Journal of Food Science**, n.3, p. 3-20, 1989.

CARDELLO, H.M.A.B.; CARDELLO, L. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangífera indica* L.) var. haden, durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.2, p.211-217, 1998.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, n.23, p. 60-70, 2006.

CASTRO, A. Hidratos de carbono. In: CASTRO, A. G. **A química e a reologia no processamento dos alimentos**. Lisboa: Ciência e Técnica, 2003, 295p.

CENZANO, I.; MADRID, A. **Tecnología de la elaboración de los helados**. Madrid (España), 1995. p.376.

CHAMPAGNE, C.P.; BLAHUTA, N.; GAGNON, C. A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68, p.681-688, 2000.

CHAVES, J. B. P.; SPROSSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: UFV, 2001. p. 81.

COELHO, D.T.; ROCHA, J.A.A. **Práticas do processamento de produtos de origem animal**. Viçosa: UFV, 2005, 64p.

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v.8, p.487-490, 1998.

CORREIA, R.T.P.; PEDRINI, M.R.S.; MAGALHÃES, M.M.dos A. Sorvete: aspectos tecnológicos e estruturais. **Higiene Alimentar**, v.21, n.148, p.19-23, 2007.

CUI, J.H.; GOH, J.S.; KIM, P.H.; CHOI, S.H.; LEE, B.J. Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 210, p. 51-59, 2000.

DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **Journal Dairy Sciences**, v.83, n.4, p.666-673, 2000.

DE OLIVEIRA, A.L.; SILVA, M.G.F.; SOBRAL, P.J.do A.; DE OLIVEIRA, C.A.F.; HABITANTE, A.M.Q.B. Propriedades físicas de misturas para sherbet de mangaba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.6, p.581-586, 2005.

DE VRESE, M. ; STEGELMANN, A. ; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.421S-429S, 2001.

DONBROW, M. **Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p.1-13.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, v.42, p.36-151, 1988.

EARLY, R. **Tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, 2000. p.459.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La - 05) and *B. lactis* (Bb - 12) and evaluation on their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 4, p. 485-494, 2002.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

GARDINER, G.E.; ROSS, R.P.; WALLACE, J.M.; SCANLAN, F.P.; JAGERS, P.P.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; STANTON, C. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.47, n.12, p.4907-4916, 1999.

GOFF, H. D. Colloidal aspects of ice cream – a review. **International Dairy Journal**, v.7, n.6-7, p.363-373, 1997.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, p. 267- 285, 1998.

GOOF, H.D. Structure of ice cream. Dairy Science and Technology website, University of Guelph, 2005. Disponível em < <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/icstructure.html>>. Acesso em: 07 de outubro de 2007.

GRANGER, C.; LEGER, A.; BAREY, P.; LANGENDORFF, V.; CANSELL, M. Influence of formulation on the structural networks in ice cream. **International Dairy Journal**, v.15, p.255-262, 2005.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D.K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R.J. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.14, p.75-107, 1994.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v.360, p.512-518, 2003.

HAMILTON-MILLER, J.M.T., SHAH, S., WINKLER, J.T. Public health issues arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. **Public Health Nutrition**, v.2, n.2, p.223-229, 1999.

- HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. **Lactic acid bacteria in health and disease 1**. Amsterdam : Elsevier Applied Science, 1992. p.151-170.
- HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, v.35, n.2-3, p.109-116, 2002.
- INGHAM, S.C. Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* iodoacetate medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products. **Journal Food Protection**, v.62, n.1, p.77-80, 1999.
- JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **Lebensmittel – Wissenschaftat Technologie**, v. 24, p.289-297, 1991.
- JANKOWSKI, T.; ZIELINSKA, M.; WYSAKOWSKA, A. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 31-34, 1997.
- JIN, L.Z.; MARQUARDT, R.R.; BAIDOO, S.K. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.5, p.619-624, 2000.
- JOBIN, G.; GRONDIN, G.; COUTURE, G.; BEAULIEU, C. Microscopic Examination of Chitosan–Polyphosphate Beads with Entrapped Spores of the Biocontrol Agent, *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76. **Microscopy and Microanalysis**, v.11, p.154-165, 2005.
- KAILASAPATHY, K.; MASONDOLE, L. Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 60, p. 252-258, 2005.
- KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. L. *acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. – their therapeutic potential and survival in yoghurt. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 52, p. 28-35, 1997.
- KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 3-13, 2003.
- LACROIX, C., PAQUIN, C., ARNAUD, J.P. Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*. Optimisation of the rheological properties of the entrapment gel matrix. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 403-408, 1990.

LEE, T.H.; AHN, J.C.; RYU, D.Y. Performance of an immobilized yeast reactor system for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.5, p.41-45, 1983.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. p. 211.

LLUNCH, M.A.; HERNANDO, I.; PÉREZ-MUNUERA, I. Lipids in food structures. In: Z.E. Sikorski; A. Kolakowska (Ed.). **Chemical and functional properties of food lipids**. Boca Raton, FL.: CRC Press, 2003. p.292-310.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.

MAGARIÑOS, H.; SELAIVE, S.; COSTA, M.; FLORES, M.; PIZARRO, O. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. Lactis Bb-12) in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, n.2, p.128-134, 2007.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.109-122, 2006.

MORALES, A.A. **La evaluacion sensorial de los alimentos em la teoria y la pratica**. Zaragoza/Espanha: Acribia, 1994.

MORTAZAVIAN, A., RAZAVI, S. H., EHSANI, M. R., SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1-18, 2007.

MOSQUIM, Maria. C. A. **Fabricando sorvete com qualidade**. São Paulo: Varela, 1999. p.120.

MUTHUKUMARASAMY, P.; HOLLEY, R.A. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, n.2, p.164-169, 2006.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.1, p.13-126, 1999.

NICETIC, M.; KAILASAPATHY, K.; TARASOFF, L. 1999. **Mechanical stability of food gum gels for immobilization of probiotic bacteria**. The 8th Intl. Workshop on Bioencapsulation: Recent progress in research and Technology, Norway, Sept. 13-15, Abstract, P11.

NIELSEN, A.F.; BERTELSEN, P.; KRISTENSEN, H.G.; HOYGAARD, L. Helium pycnometry as a tool for assessment of sealing efficiency in microencapsulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, In Press, 2007.

O'RIORDAN, K.O.; ANDREWS, D.; BUCKLE, K.; CONWAY, P. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p.1059-1066, 2001.

O'SULLIVAN, D. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1751–1760, 2001.

OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, n.1-2, p.135-140, 2001.

OLIVEIRA, A.C. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.

OLIVEIRA, M.C.L. Avaliação sensorial e caracterização química de queijo fresco cremoso obtido por ultrafiltração de leite fermentado e de bebida láctea elaborada a partir do permeado. 2004. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J.P.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Food Science**, v.67, n.6, p.2336-2341, 2002.

ORDÓÑEZ, J.A.; DÍAZ, O.; COBOS, A.; HOZ, L. **Tecnologia de alimentos – Alimentos de origem animal**. Vol.2. Tradução: Fátima Murrad. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v.18, p.303-319, 2000.

PERALTA, M.U.; HUAPAYA, M.O.D.; MOLINA, O.G. **Evaluación sensorial de los alimentos**. Peru: Agraria, 1999. 167p.

PICOT, A.; LACROIX, C. Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. **International Dairy Journal**, v.13, p.455-462, 2003.

PILKINGTON, P.H.; MARGARITAS, A.; MENSOUR, N. A., RUSSEL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. **Journal Instrumentals Brewer**, v. 104, p.19-31, 1998.

PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001.cap.16, p.355-372.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALEDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Science Technology**, v.13, p.3-11, 2002.

RAMAKRISHNA, S.V.; PRAKASHAM, R.S. Microbial fermentations with immobilized cells. **Current Science**, v.77, p.87-100, 1999.

RAYMUNDO, A. Emulsões alimentares. In: A. Castro (Ed.). **A química e reologia no processamento de alimentos**. Lisboa: Ciência e Técnica, 2003. 295p.

REIG, A. L. C.; ANESTO, J. B. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. Instituto de Nutrición e Hgiene de los Alimentos. **Revista Cubana de Alimentação e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 63-8, 2002.

ROBINSON, R.K. **Microbiologia lactologica**. v. 2. Zaragoza: Acribia, 1987, 298p.

RODRIGUEZ, J.M. Antimicrobial spectrum, structure, properties and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. **Food Science and Technology International**, v.2, n.2, p.61-68, 1996.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. **Journal of Food Science**, v.50, p.139-144, 1985.

ROTHWELL, J. Microbiology of ice cream and related products. In: ROBINSON, R.K. (Ed.). **Dairy Microbiology: the microbiology of milk products**. 2.ed. London: Elsevier, 1990. v.2, cap.1, p.1-40.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, n.3, p.197-215, 2000.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria**, New York: Marcel Dekker, 1993. 442 p.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, n. 5-6, p.341- 347, 1998.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANDHOLM, M.T.; MYLLÄINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDO, R.; SAARELA, M. Tecnological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, n.12, p.173-182., 2002.

SELMER-OLSEN, E.; SORHAUG, T.; BIRKELAND, S.E.; PEHRSON, R. Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, p. 79–85, 1999.

SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA, W. E. V.; BRITZKYLE, M. L.; KYLE, W.S.A.. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in comercial yoghurt during storage. **International Dairy Journal**, v.5, p.515 –521, 1995.

SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Australian Journal Dairy Technology**, v.55, p.139-144, 2000.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Micro-encapsulation of Lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal Food Science**, v.54, n.3, p.557-561, 1993.

SHEU, T.Y.; MARSHALL, R.T; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.1902-1907, 1993.

SOFJAN, R.P.; HARTEL, R.W. Effects of overrun on structural and physical characteristics of ice cream. **International Dairy Journal**, v.14, n.3, p.255-262, 2004.

SOUZA JUNIOR, W. C. Imobilização de células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactoligossacarídeos. 2006. 67f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R., **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.27-58.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v.8, p.491-496, 1998.

STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory Evaluation Practices**. 2 Ed. San Diego: Academic Press, 1995. 338p.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate - starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 47-55, 2000.

SZCZESNIAK, A.S. Effect of storage on texture. In: I.A. Taub; R.P. Sinch (Ed). **Food storage stability**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. p.199-251.

TRGO, C. Factors affecting texture of ice cream. In: MACKENNA, B.M. **Texture in food: semi-solid foods**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003, v.1, 448p.

VALENGA, F. Estudos de interação entre galactomanana e alginato e possíveis aplicações. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Milk and Milk Products**, v.1. London: Chapman and Hall, 1994. p.386-437.

VILLANI, F.; PEPE, O. ; MAURIELLO, G. ; SALZANO, G. ; MOSCHETTI, G. ; COPOLLA, S. Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, n.2, p.179-190, 1995.

VITOLO, M. Imobilização e células e enzimas. **Biotecnologia**, n. 11, p.2, jan., 1988.

WEISBERG, E. Sorvete é alimento e pode ser consumido o ano inteiro. **Leite e Derivados**, v.85, n.55, 2005.

WILDEMOSER, H.; SCHEIWILLER, J.; WINDHAB, E.J. Impact of disperse microstructure on rheology and quality aspects of ice cream. **Lebensmittel Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 37, p. 881-891, 2004.

ZHANG, F. J.; CHENG, G. X.; YING, X. G. Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, p. 712-719, 2006.

CAPÍTULO 2

SOBREVIVÊNCIA DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* (LA-5), MICROENCAPSULADO POR EMULSIFICAÇÃO OU POR SPRAY DRYING, DURANTE A ESTOCAGEM E SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS

Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* (La-5), microencapsulado por emulsificação e por spray drying, durante a estocagem e sob condições gastrointestinais simuladas

Juliana G. Lorenz^a, Fabiane P. de Castro^a, Maiara A. Spillere^a, Ernani S. Sant'Anna^{a,*}

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Resumo

Neste estudo foi comparado o efeito de duas diferentes técnicas de microencapsulação na sobrevivência da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* (La-5). Para isso, células de *Lactobacillus acidophilus* foram microencapsuladas em gel de alginato pela técnica de emulsificação ou por spray drying. As diferentes microcápsulas foram submetidas à análise de microestrutura e a testes de sobrevivência em baixa temperatura de estocagem (-18 ± 2 °C) e sob condições gastrointestinais simuladas, como incubação em pHs ácidos (pH 1,0, 2,0 e 3,0) e em diferentes concentrações de sais de bile (0,5 % e 1,0 %). Através da análise de microestrutura foram observadas variações no formato externo das cápsulas conforme a técnica de microencapsulação utilizada. As cápsulas produzidas por emulsificação apresentaram superfície pouco rugosa com formato elíptico e as cápsulas produzidas por spray drying apresentaram formato esférico e superfície rugosa. Ambas as técnicas de microencapsulação foram eficazes para a proteção do *Lactobacillus acidophilus* contra possíveis danos causados pela baixa temperatura de estocagem. Entretanto, a microencapsulação por emulsificação resultou em menor proteção as células em condições de pH ácido e sais de bile do que a microencapsulação por spray drying.

Palavras-chave: Microencapsulação. Probióticos. *Lactobacillus acidophilus*. Emulsificação. Spray drying. Sobrevivência.

Abstract

In this study the effect of two different microencapsulation techniques was compared in the survival of the probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* (La-5). For that, cells of *Lactobacillus acidophilus* were microencapsulated in alginate gel by the emulsification technique or by spray drying. The different microcapsules were submitted to the microstructure analysis and to survival tests in low storage (-18 ± 2 °C) temperature or under simulated gastrointestinal conditions, as incubation in pH acids (pH 1.0, 2.0 and 3.0) and in

different concentrations of bile (0.5% and 1.0%) salts. Through the microstructure analysis were observed variations in the external shape of the capsules according to the technique of microencapsulation used. The capsules produced by emulsification presented a little wrinkled surface with elliptic shape and the capsules produced by spray drying presented spherical shape and wrinkled surface. Both microencapsulation techniques were effective for the protection of the *Lactobacillus acidophilus* against possible damages caused by the low storage temperature. However, the microencapsulation by emulsification resulted in smaller protection to the cells in conditions of acid pH and bile salts than the microencapsulation for spray drying.

Keywords: Microencapsulation. Probiotic. *Lactobacillus acidophilus*. Emulsification. Spray drying. Survival.

1 Introdução

Bactérias ácido lácticas (LAB), como o *Lactobacillus acidophilus*, são microrganismos probióticos importantes, tipicamente associados a inúmeros benefícios a saúde humana, principalmente a regulação do transito gastrointestinal (ALLAN-WOJTAS et al., 2008; REID et al., 2006). Tais microrganismos vêm sendo freqüentemente adicionados, como culturas secas ou concentradas, em produtos alimentícios convencionais, suplementos alimentares e várias preparações farmacêuticas (PICOT; LACROIX, 2003).

Um dos pré-requisitos necessários para o uso comercial dos microrganismos probióticos é a sua sobrevivência em número suficientemente elevado, durante a produção e a estocagem dos produtos e até que alcancem o intestino humano (ANNAN et al., 2008; KAILASAPATHY; CHIN, 2000; MARTONI et al., 2008). Segundo Huang e Adams (2004) e Ross et al. (2005) condições extremamente ácidas como as encontradas no estomago podem diminuir significativamente o número de células probióticas viáveis que chegam ao intestino. Para tentar solucionar este problema técnicas de microencapsulação podem ser utilizadas.

A microencapsulação é definida, do ponto de vista microbiológico, como o processo pelo qual as células microbianas são retidas em uma matriz polimérica, formando microesferas semipermeáveis, com diâmetros que variam de poucos microns a 1 mm (YOW; ROUTH, 2006). Essas microesferas podem liberar seu conteúdo sob condições específicas (FAVARO-TRINDADE et al., 2008) e protegê-lo contra ambientes agressivos como as baixas temperaturas de congelamento, a presença de oxigênio e durante o trânsito gastrointestinal (KRASAEKOOPT et al., 2003; MORTAZAVIAN et al., 2006).

Entre as técnicas de microencapsulação mais antigas está a emulsificação. Na emulsificação as cápsulas são formadas pela dispersão de uma fase aquosa (contendo as células probióticas e um polímero em suspensão) em uma fase orgânica (como um óleo vegetal), resultando numa emulsão de água em óleo (CAPELA et al., 2007). As cápsulas são solidificadas pela adição lenta de um agente gelificante, produzindo microcápsulas de pequenos diâmetros (25 μm – 1 mm) (MORTAZAVIAN et al., 2007). Anal e Singh (2007) e Muthukumarasamy et al. (2006) reportaram estudos mostrando o aumento da estabilidade das bactérias ácido lácticas quando encapsuladas pelo método de emulsificação, utilizando como material de revestimento alginato de sódio. Atualmente a emulsificação vem sendo substituída por novas tecnologias de microencapsulação como, por exemplo, spray drying.

A microencapsulação por spray drying envolve a dispersão das células em uma solução polimérica que é atomizada na câmara de secagem (GHARSALLAOUI et al., 2007). Isso leva a evaporação do solvente e, conseqüentemente, a formação das microcápsulas (KAILASAPATHY, 2002). Segundo Zhao et al. (2008) pesquisas tem mostrado que a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* por spray drying pode resultar numa elevada sobrevivência e estabilidade da bactéria encapsulada. Além disso, o uso do spray dryer possibilita com maior facilidade a microencapsulação em escala industrial, produzindo grande quantidade de microcápsulas de forma econômica e eficaz (ANAL E SINGH, 2007).

São muitas as técnicas de microencapsulação atualmente existentes, o grande desafio é selecionar a mais eficiente e apropriada, considerando o tipo de material de revestimento, a espécie bacteriana e a aplicação a que será destinada (ANAL; SINGH, 2007). Pensando nisso e na necessidade de estudos comparativos envolvendo duas ou mais técnicas, o objetivo deste trabalho foi comparar o efeito da microencapsulação por emulsificação ou por spray drying na sobrevivência da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* (La-5) durante a estocagem em temperatura de congelamento e sob condições gastrointestinais simuladas.

2 Materiais e Métodos

2.1 Preparação da cultura

Uma solução estoque, contendo aproximadamente 9 log UFC/ml, foi obtida pela adição de cultura pura e liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) (Chr. Hansen, Hønsholm, Dinamarca), em uma solução estéril de leite em pó desnatado 12 % (m/v). A solução estoque foi mantida a temperatura de -18 ± 2 °C e reativada em estufa a 37 °C durante 4 horas antes de ser utilizada nos processos de microencapsulação. Células livres liofilizadas (não-encapsuladas) foram utilizadas como padrão nas análises de sobrevivência das microcápsulas.

2.2 Microencapsulação

Microcápsulas foram preparadas em gel de alginato de sódio 3 % (m/v) (Vetec, MG Química Comercial, Brasil) através da técnica de emulsificação, seguida de secagem por liofilização, e através da técnica de spray drying. Todos os reagentes e materiais utilizados foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos.

2.2.1 Técnica de emulsificação

As microcápsulas foram produzidas a partir de uma emulsão (água/óleo) de acordo com o método descrito por Sheu e Marshall (1993) com pequenas modificações. A solução estoque de *Lactobacillus acidophilus* em leite em pó desnatado 12 % (m/v) foi centrifugada (3000 x g, 15 min., 4°C), lavada duas vezes e suspensa em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0). A suspensão foi misturada a uma solução de alginato de sódio 3% (m/v) numa proporção de 1:4 (v/v). Uma parte dessa mistura foi adicionada a 5 partes de óleo de soja (v/v) contendo 0,2 % de polioxietileno (20) sorbitan monooleato, e agitada vigorosamente até a formação de uma emulsão uniforme. Cerca de 500 ml de CaCl₂ 0,05 M foram adicionados a mistura ainda sob agitação provocando a quebra da emulsão. Após 15 minutos de repouso as microcápsulas formadas foram coletadas por centrifugação (1000 x g, 10 min), lavadas duas vezes com água estéril e suspensas em leite em pó desnatado 12 % (m/v). Essa suspensão foi congelada a -18 ± 2 °C e posteriormente liofilizada por 48 horas usando liofilizador de bancada (Fauvel LT 1000, Terroni Equipamentos Científicos, Brasil) sob 5 mmHg.

2.2.2 Técnica de spray drying

Na produção de microcápsulas por spray drying uma mistura contendo 100 ml da solução estoque de *Lactobacillus acidophilus* em leite em pó desnatado 12 % (m/v) e 250 ml de alginato de sódio 3 % (m/v) foi homogeneizada durante 5 minutos em agitador magnético e submetida à secagem em spray dryer de escala laboratorial (B-290 mini *spray dryer*, Buchi, Flawil, Suíça), operado com temperatura de entrada de ar de 150 °C e temperatura de saída de ar de 50 – 60 °C. O pó de microcápsulas foi coletado na parte inferior do ciclone.

2.3 Estocagem das células livres e microencapsuladas

As células livres e as microcápsulas produzidas por emulsificação e por spray drying foram estocadas separadamente em recipientes de vidro, hermeticamente fechados, sob congelamento a -18 ± 2 °C. A enumeração de células viáveis foi realizada, em triplicata, no primeiro dia de estocagem e semanalmente num período de 12 semanas.

2.4 Análise de microestrutura

A aparência externa das microcápsulas foi observada por microscopia eletrônica de varredura. As microcápsulas foram fixadas com uma fita dupla face em stubs de alumínio e recobertas por uma fina camada de ouro (SCD 005, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As observações foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (Philips XL-30, Philips Eletric Corporation, Eindhoven, Holanda) com voltagem de aceleração de 10 KV (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002).

2.5 Sobrevivência das células livre e microencapsuladas em níveis de pH similares aos do estômago humano

O meio NGYC (12 % de leite em pó desnatado, 2 % de glicose, 1 % de extrato de levedura e 0,05 % de cisteína), foi usado para simular as condições gástricas humanas como descrito por Lankaputhra e Shah (1995), com modificações. Todos os materiais e reagentes foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos. As células livres ou microencapsuladas foram adicionadas, na quantidade de 0,1 g, em tubos contendo 9,9 ml de meio NGYC, ajustados para pH 1,0, 2,0, 3,0 ou 6,5 (controle) com HCl 5 M ou NaOH 1 M. Os tubos foram homogeneizados durante 30 s em agitador tipo vortex e incubados por 0, 1, 2 e 3 h a 37 °C com agitações periódicas. Ao final de cada tempo de incubação o conteúdo de células viáveis foi enumerado. A análise foi realizada em triplicata.

2.6 Sobrevivência das células livres e microencapsuladas aos sais de bile

A resistência aos sais de bile foi analisada por inoculação de 0,1 g de células livres ou microencapsuladas em 9,9 ml de meio NGYC (12 % de leite em pó desnatado, 2 % de glicose, 1 % de extrato de levedura e 0,05 % de cisteína) estéril (pH 6,9) contendo 0 (controle), 0,5 % ou 1,0 % de bile (Oxgall, Sigma). As amostras foram homogeneizadas durante 30 s em agitador tipo vortex e incubadas a 37 °C com agitações periódicas. Após 0, 3 e 6 h de incubação o conteúdo de células viáveis foi enumerado (CHANDRAMOULI et al, 2004). A análise foi realizada em triplicata.

2.7 Enumeração de células viáveis

O meio MRS (DeMan Rogosa and Sharpe, Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado para a enumeração do conteúdo de células viáveis livres e microencapsuladas. Diluições seriadas das amostras em água peptonada 0,1 % (m/v) foram plaqueadas em profundidade e incubadas a 37 ± 2 °C por 72 h sob anaerobiose, em jarras anaeróbicas contendo AnaeroGen[®]

(Oxoid, Reino Unido). A contagem de células viáveis foi expressa em log de unidade formadora de colônia por g ou mL (log UFC/g ou mL).

As microcápsulas foram anteriormente resuspendidas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e homogeneizadas em agitador magnético durante 30 minutos (SHEU e MARSHALL, 1993) para a liberação das células.

2.8 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o software Statistica versão 6.0 (2001) (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA). O teste de Tukey foi utilizado para comparação das médias, com nível de significância de 5 %, quando encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

3 Resultados e Discussão

3.1 Análise de microestrutura

A Microscopia Eletrônica de Varredura permitiu observar diferenças na aparência externa das microcápsulas produzidas pelas técnicas de microencapsulação estudadas (Figura 1). As microcápsulas produzidas por emulsificação apresentaram em sua maioria, formato elíptico e superfície não porosa contendo algumas bactérias ligadas, o que evidencia um revestimento pouco uniforme (Figura 1A e 1B). As microcápsulas produzidas por spray drying apresentaram formato arredondado, com a presença de concavidades ou achatamentos. Estas possuíam superfície mais rugosa e tamanhos menores do que as obtidas por emulsificação (Figura 1C e 1D). Segundo O’Riordan et al. (2001) características como concavidades ou achatamentos, presentes na superfície das cápsulas, são resultado das altas temperaturas de secagem aplicadas pelo spray dryer. Lian et al. (2002) denominou tais concavidades como “efeito bola vazia” e afirmou que a ocorrência desse efeito também depende do tipo de material encapsulante utilizado no processo.

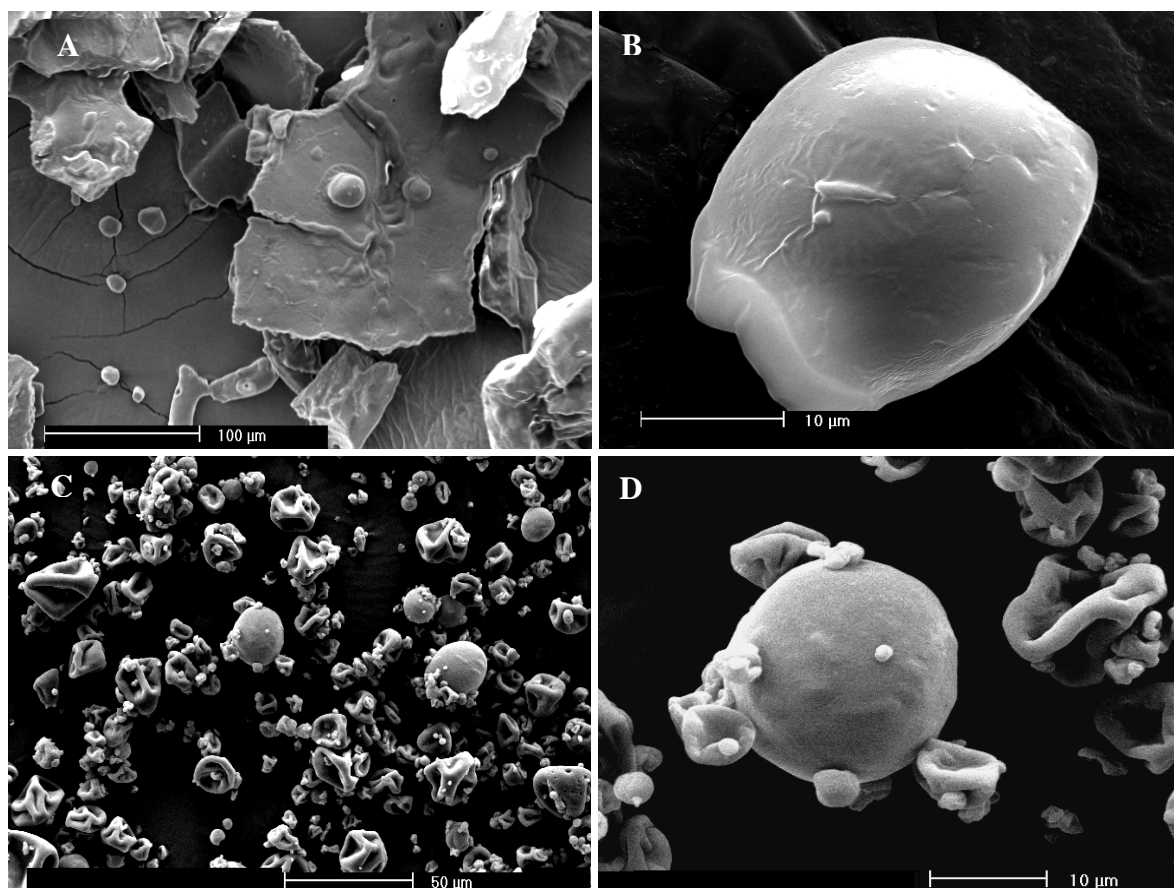


Figura 1. Micrografias das cápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* (La-5) (A) e (B) microencapsulado pela técnica de emulsificação; e (C) e (D) microencapsulado pela técnica de spray drying.

3.2 Sobrevivência das células livres e microencapsuladas durante a estocagem

A sobrevivência das células microencapsuladas foi superior a das células livres durante a estocagem em temperatura de congelamento. A contagem mostrou uma redução de 4,3 ciclos log (de $(2,95 \pm 0,05) \times 10^9$ UFC/g para $(1,42 \pm 0,02) \times 10^5$ UFC/g) na viabilidade das células livres após 12 semanas de estocagem a -18 ± 2 °C. No mesmo período, a viabilidade das células microencapsuladas diminuiu 1,77 ciclos log (de $(1,65 \pm 0,05) \times 10^8$ UFC/g para $(2,8 \pm 0,14) \times 10^6$ UFC/g) e 1,75 ciclos log (de $(1,90 \pm 0,40) \times 10^8$ UFC/g para $(4,0 \pm 0,10) \times 10^6$ UFC/g) quando produzidas por emulsificação e por spray drying, respectivamente (Figura 2). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a sobrevivência das células

microencapsuladas por emulsificação ou por spray drying durante as 12 semanas de estocagem em temperatura de congelamento.

Segundo Desmond et al. (2002) e Tsen et al. (2007) diversos estudos mostraram que temperaturas mais baixas podem assegurar uma maior taxa de sobrevivência as células microencapsuladas, porém a mortalidade das células aumenta com o tempo de estocagem. Resultados semelhantes foram encontrados por Sheu et al. (1993), os quais reportaram que a microencapsulação por emulsificação aumentou a sobrevivência de células de *Lactobacillus bulgaricus* (L2), submetidas a estocagem em -18°C . Zhao et al. (2008) também relataram uma redução de 3,0 a 4,0 ciclos log na viabilidade de células livres de *Lactobacillus acidophilus* (XH1) e de aproximadamente 1,0 ciclo log na viabilidade das células microencapsuladas em spray dryer durante 8 semanas de estocagem a 4°C .

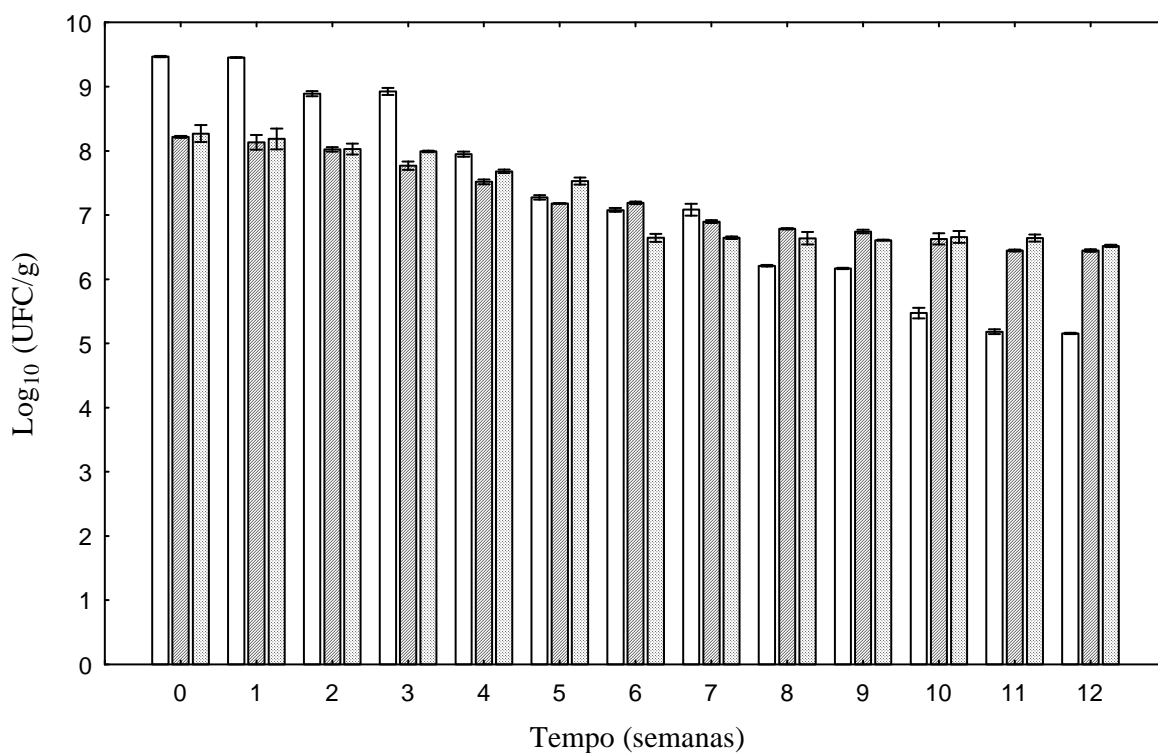


Figura 2. Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) livre, microencapsulado por emulsificação e microencapsulado por spray drying, durante estocagem a $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$. As barras de erro representam o desvio padrão em relação as médias ($n = 3$). A semana 0 corresponde a contagem de células viáveis (UFC/g) realizada no primeiro dia de estocagem.

3.3 Sobrevivência das células livre e microencapsuladas em níveis de pH similares aos do estômago humano

O caráter protetor das técnicas de microencapsulação, em níveis de pH similares aos encontrados no estômago humano, pode ser observado nos gráficos da Figura 3. As curvas de sobrevivência mostraram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na viabilidade das células livres e das células microencapsuladas por emulsificação ou por spray drying para o pH 6,5 (controle) (Figura 3A).

Em pH 3,0 a viabilidade das células livres sofreu redução de 2,23 ciclos log (de $(1,88 \pm 0,02) \times 10^8$ para $(1,10 \pm 0,14) \times 10^6$ UFC/mL) após 3 h de incubação. As células microencapsuladas por emulsificação não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) na viabilidade durante todo o período de incubação, enquanto que as células microencapsuladas por spray drying apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) de 1,05 ciclos log (de $(1,80 \pm 0,11) \times 10^8$ para $(1,99 \pm 0,01) \times 10^7$ UFC/mL) na primeira hora de incubação (Figura 3B).

Reduções de 3,72 ciclos log (de $(1,86 \pm 0,06) \times 10^8$ para $(3,60 \pm 0,56) \times 10^4$ UFC/mL) foram observadas na viabilidade das células livres após 3 h de incubação em pH 2,0. Neste período, as células microencapsuladas por emulsificação e por spray drying sofreram redução de 2,48 ciclos log (de $(1,84 \pm 0,03) \times 10^8$ para $(6,50 \pm 0,35) \times 10^5$ UFC/mL) e 1,76 ciclos log (de $(1,67 \pm 0,08) \times 10^8$ para $(3,00 \pm 0,98) \times 10^6$ UFC/mL), respectivamente (Figura 3C).

Em pH 1,0 o conteúdo de células livres foi completamente destruído após 2 h de incubação, enquanto que após 3 h de incubação foram observadas reduções de 3,36 ciclos log (de $(1,45 \pm 0,07) \times 10^8$ para $(6,50 \pm 0,21) \times 10^4$ UFC/mL) para as microcápsulas produzidas por emulsificação e 2,80 ciclos log (de $(1,01 \pm 0,12) \times 10^8$ para $(1,60 \pm 0,14) \times 10^5$ UFC/mL) para as microcápsulas produzidas por spray drying (Figura 3D).

Os resultados mostraram que tanto a microencapsulação por emulsificação quanto a microencapsulação por spray drying melhoraram a sobrevivência das células de *Lactobacillus acidophilus*, para todos os pHs analisados, em relação as células livres. Estudos como o de Ding e Shah (2007) já haviam apontado que a imobilização em gel de alginato, através de diferentes técnicas de microencapsulação, pode ser eficiente no aumento da resistência da bactéria probiótica para baixos pHs. Entretanto, segundo Lee e Heo (2000) e Oliveira (2006) o aumento da sobrevivência de bactérias probióticas microencapsuladas depende não só do material usado no revestimento, mas também do tipo de revestimento, da concentração do gel e do tamanho das microcápsulas.

No presente trabalho, as microcápsulas produzidas por emulsificação apresentaram-se menos resistentes aos pHs 2,0 e 1,0 do que as produzidas por spray drying. Uma explicação para este resultado está no revestimento não uniforme das células pela técnica de emulsificação, que permitiu a presença de bactérias ligadas a superfície das microcápsulas, deixando-as mais expostas as condições adversas do meio.

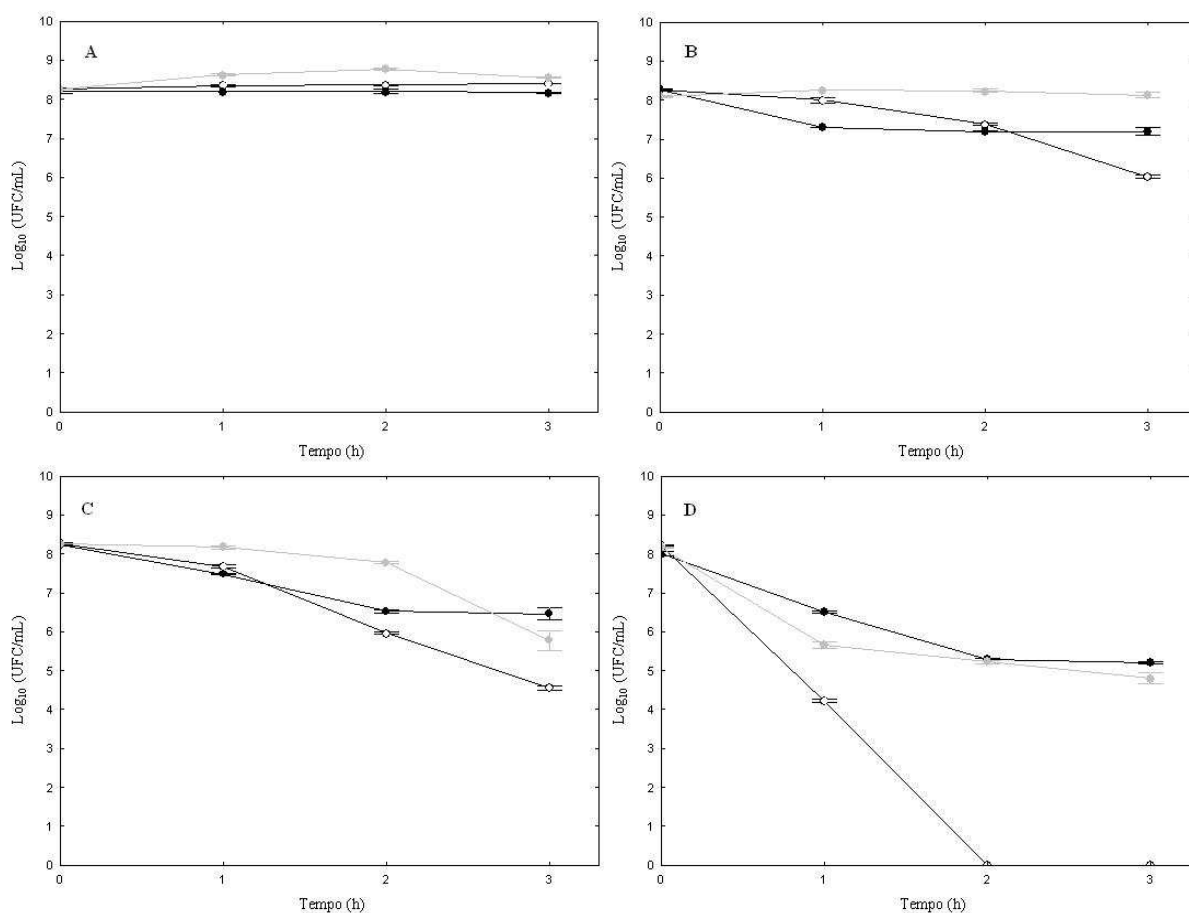


Figura 3. Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) (o) livre, (●) microencapsulado por emulsificação e (●) microencapsulado por spray drying em (A) pH 6,5 (controle), (B) pH 3,0, (C) pH 2,0 e (D) pH 1,0. As barras de erro representam o desvio padrão em relação as médias (n = 3).

3.4 Sobrevivência das células livres e microencapsuladas aos sais de bile

Os valores médios de viabilidade das células livres e microencapsuladas durante 6 h de exposição a diferentes concentrações de sais de bile estão mostrados na Tabela 1. A

viabilidade das células livres foi afetada apenas pela concentração de 1,0 % de bile, apresentando redução significativa ($p < 0,05$) de 1,63 ciclos log (de $(6,10 \pm 0,14) \times 10^7$ para $(1,50 \pm 0,70) \times 10^6$ UFC/mL) em 6 h de incubação. A microencapsulação protegeu as células probióticas, melhorando a sua sobrevivência a 1,0 % de sais de bile. Entretanto, a técnica de emulsificação produziu cápsulas menos tolerantes a bile do que as produzidas por spray drying, uma vez que após 6 h de incubação a 1,0 % de bile as células microencapsuladas por emulsificação apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) de 0,77 ciclos log (de $(1,80 \pm 0,01) \times 10^8$ para $(3,05 \pm 0,21) \times 10^7$ UFC/mL) na viabilidade. Por outro lado, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na viabilidade das células microencapsuladas por spray drying.

Mandal et al. (2006) e Sultana et al. (2000) também relataram uma pequena redução na viabilidade de diferentes bactérias probióticas microencapsuladas por emulsificação quando expostas a 1,0 % e 2,0 % de sais de bile. Além disso, Lian et al. (2003) mostraram que microcápsulas contendo *Bifidobacterium infantis* (CCRC 14633) produzidas por spray drying foram extremamente resistentes a 0,5 % e 2,0 % de bile durante 12 h de incubação. Estes resultados, assim como os obtidos na análise de sobrevivência em diferentes níveis de pH, são consequência do mau revestimento das microcápsulas produzidas por emulsificação, reduzindo a proteção das células, quando comparadas àquelas microencapsuladas por spray drying.

Tabela 1. Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus*, livre e microencapsulado (\log_{10} UFC/mL), durante 6 h de incubação em solução de sais de bile.

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bile (%)	Tempo (horas)		
		0	3	6
Livre	0	$8,09 \pm 0,04^a$	$8,24 \pm 0,01^b$	$8,41 \pm 0,00^c$
	0,5	$7,95 \pm 0,03^a$	$7,82 \pm 0,05^a$	$7,66 \pm 0,15^a$
	1,0	$7,78 \pm 0,01^a$	$7,45 \pm 0,05^a$	$6,15 \pm 0,21^b$
Microencapsulado por emulsificação	0	$8,17 \pm 0,04^a$	$8,25 \pm 0,00^{ab}$	$8,57 \pm 0,14^b$
	0,5	$8,25 \pm 0,05^a$	$8,09 \pm 0,10^{ab}$	$7,93 \pm 0,01^b$
	1,0	$8,25 \pm 0,00^a$	$8,17 \pm 0,08^a$	$7,48 \pm 0,03^b$
Microencapsulado por spray drying	0	$7,93 \pm 0,01^a$	$8,15 \pm 0,10^a$	$8,72 \pm 0,01^b$
	0,5	$8,28 \pm 0,04^a$	$8,16 \pm 0,01^a$	$8,00 \pm 0,03^a$
	1,0	$8,06 \pm 0,09^a$	$7,99 \pm 0,03^a$	$7,79 \pm 0,09^a$

* Resultados expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$). Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias.

Em conclusão, ambas as técnicas de microencapsulação estudadas (emulsificação e spray drying) foram eficientes para a proteção das células de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) contra possíveis danos causados pelas temperaturas de congelamento. No entanto, as microcápsulas produzidas por spray drying foram mais resistentes ao meio ácido e a presença de sais de bile do que as microcápsulas produzidas por emulsificação. Ao contrário da emulsificação, a microencapsulação por spray drying resultou num revestimento mais uniforme das células, protegendo-as melhor contra danos causados por condições adversas do meio. Assim, o uso da técnica de microencapsulação por spray drying em gel de alginato de sódio possibilitaria a incorporação de *Lactobacillus acidophilus* em inúmeros novos produtos de forma fácil, segura e eficaz.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências bibliográficas

- ALLAN-WOJTAS, P., TRUELSTRUP HANSEN, L., PAULSON, A.T. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 101-108, 2008.
- ANAL, A. K., SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n.5, p. 240-251, 2007.
- ANNAN, N. T., BORZA, A. D., TRUELSTRUP HANSEN, L. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 184–193, 2008.

CAPELA, P., HAY, T. K. C., SHAH, N. P. Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 40, n. 10, p. 1261–1269, 2007.

CHANDRAMOULI, V., KAILASAPATHY, K., PEIRIS, P., JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 1, p. 27– 35, 2004.

DESMOND, C.; ROSS, R.P.; O'CALLAGHAN, E.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 1003-1011, 2002.

DING, W.K.; SHAH, N.P.; Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, 2007.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 4, p. 485-494, 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C. S., PINHO, S. C., ROCHA, G. A. Review: Microencapsulation of food ingredients. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107–1121, 2007.

HUANG, Y., ADAMS, M.C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 253– 260, 2004.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 39-48, 2002.

KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B., DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, n.1, p. 3-13, 2003.

LANKAPUTHRA, W.E.V., SHAH, N. P. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* in the presence of acid and bile salts. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 30, p. 2-7, 1995.

LEE, K.Y.; HEO, T.R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 869–873, 2000.

LIAN, W.C., HSIAO, H.C., CHOU, C.C. Survival of bifidobacteria after spray drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 79–86, 2002.

LIAN, W.C.; HSIAO, H.C.; CHOU, C.C. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 293–301, 2003.

MANDAL, S.; PUNIYA, A.K.; SINGH, K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1190–1195, 2006.

MARTONI, C., BHATHENA, J., URBANSKA, A. M., PRAKASH, S. Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 225–233, 2008.

MUTHUKUMARASAMY, P.; ALLAN-WOJTAS, P.; HOLLEY, R. A. Stability of *Lactobacillus reuteri* in Different Types of Microcapsules. **Journal of Food Science**, v. 17, n. 1, p. 20–24, 2006.

MORTAZAVIAN, A. M., EHSANI, M. R., MOUSAVI, S. M., REINHEIMER, J. A., EMAMDJOMEH, Z., SOHRABVANDI, S., REZAEI, K. Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment incubation temperature on the viability of the probiotic microorganisms in freshly made yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 1, p. 8–11, 2006.

MORTAZAVIAN, A., RAZAVI, S. H., EHSANI, M. R., SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1–18, 2007.

OLIVEIRA, A.C. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro**. 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O'RIORDAN, K; ANDREWS, D; BUCKLE, K; CONWAY, P. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 1059–66, 2001.

PICOT, A., LACROIX, C. Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 455–462, 2003.

REID, G., KIM, S.O., Köhler, G.A. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. **FEMS - Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 149–157, 2006.

ROSS, R. P., DESMOND, C., FITZGERALD, G. F., STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n.6, p. 1410–1417, 2005.

SHEU, T. Y., MARSHALL, R. T. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v. 54, n.3, p. 557–561, 1993.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1–2, p. 47–55, 2000.

TSEN, J.H.; HUANG, H.Y.; KING, A.E. Enhancement of freezing-resistance of *Lactobacillus rhamnosus* by the application of cell immobilization. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, p. 215–219, 2007.

YOW, H. N., ROUTH, A. F. Formation of liquid core–polymer shell microcapsules. **Soft Matter**, v. 2, p. 940–949, 2006.

ZHAO, R., SUN, J., TORLEY, P., WANG, D., NIU, S. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1349–1354, 2008.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA MICROENCAPSULAÇÃO NA VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* (LA-5) E NAS PROPRIEDADES FÍSICO- QUÍMICAS E SENSORIAIS DE SORVETE

Influência da microencapsulação na viabilidade *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e nas características físico-químicas e sensoriais de sorvete

Juliana G. Lorenz^a, Fabiane P. de Castro^a, Maiara A. Spillere^a, Caroline B. de Campos^a,
Regina C. O. Torres^a, Ernani S. Sant'Anna^{a,*}

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Resumo

Benefícios terapêuticos têm levado a um aumento da incorporação de bactérias probióticas em produtos lácteos como o sorvete. Porém a eficácia da adição destas bactérias em alimentos depende da dose administrada e da manutenção de sua viabilidade durante a estocagem do produto. A proteção física dos probióticos por microencapsulação é a nova aposta para aumentar a sua sobrevivência. Pensando nisso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influencia da microencapsulação na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) adicionado em sorvetes e determinar as características físico-químicas e a aceitabilidade sensorial do produto. Dois tipos de sorvetes probióticos foram elaborados, um contendo a bactéria probiótica livre (não encapsulada) e o outro contendo a bactéria probiótica microencapsulada. A microencapsulação melhorou significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade da bactéria probiótica durante 12 semanas de estocagem dos sorvetes a -18 ± 2 °C. O conteúdo de células livres diminuiu 0,35 ciclos log após as 12 semanas, enquanto que o conteúdo de células microencapsuladas diminuiu 0,27 ciclos log. Quanto às características físico-químicas houveram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores de umidade, lipídios, proteínas, carboidratos totais, acidez e pH dos sorvetes. No entanto, a microencapsulação não influenciou a aceitabilidade sensorial do produto, sendo que ambos os sorvetes foram sensorialmente aceitos pelos julgadores.

Palavras-chave: Probiótico. Sorvete. Microencapsulação. *Lactobacillus acidophilus*. Estocagem. Aceitabilidade sensorial.

Abstract

Therapeutic benefits have led to an increase in the incorporation of probiotic bacteria in dairy products such as ice cream. However the efficacy of the addition of these bacteria in foods depends on the administered dose and of the maintenance of its viability during the

storage of the product. The physical protection of the probiotics for microencapsulation is the new bet to increase its survival. Thinking about that, the objective of this work was to evaluate the influence of the microencapsulation in the viability of *Lactobacillus acidophilus* (La-5) added in ice creams and to determine the physico-chemical characteristics and the sensorial acceptability of the product. Two types of probiotic ice creams were elaborated one containing the free probiotic bacteria (non-encapsulated) and the other containing the probiotic microencapsulated bacteria. The microencapsulation improved significantly ($p < 0.05$) the viability of the probiotic bacterium during 12 weeks of storage of the ice creams to -18 ± 2 °C. The content of free cells reduced 0.35 cycles log after the 12 weeks, while the content of microencapsulated cells reduced 0.27 cycles log. For the physico-chemical characteristics there was significant difference ($p < 0.05$) among the humidity values, lipids, proteins, total carbohydrates, acidity and pH of the ice creams. However, the microencapsulation didn't influence the sensorial acceptability of the product, and both ice creams were sensorially accepted by the judges.

Keywords: Probiotic. Ice cream. Microencapsulation. *Lactobacillus acidophilus*. Storage. Sensory acceptability.

1. Introdução

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do consumidor (SANDERS, 2003). Estas bactérias ingeridas vivas e em quantidades suficientes têm uma influência benéfica sobre a saúde humana, melhorando o balanço da microbiota intestinal e a defesa da mucosa contra patógenos (ALMEIDA et al., 2008; SHAH, 2007). Benefícios adicionais a saúde incluem a modulação da resposta imunológica, redução dos níveis séricos de colesterol, síntese de vitamina e atividade anticancerígenas (BOYLSTON et al., 2004).

Atualmente, alimentos adicionados de microrganismos probióticos, como o *Lactobacillus acidophilus*, estão ganhando popularidade e, portanto crescente interesse da indústria de produtos lácteos (GODWARD; KAILASAPATHY, 2003; ONG et al., 2006). Isso se deve a uma tendência mundial que aponta para a necessidade de que os alimentos não sejam mais somente vistos como fonte de nutrientes com apelo sensorial, mas também como fonte de bem-estar e benefícios a saúde dos indivíduos (FÁVARO-TRINDADE et al., 2008).

Segundo Vrese e Schrezenmeir (2008) iogurtes e leites fermentados são os lácteos probióticos mais encontrados no mercado. Porém são inúmeras as pesquisas visando o desenvolvimento de novos produtos como, por exemplo, diversos tipos de sorvetes, queijos, mouses, sucos de frutas e alimentos a base de soja adicionados de microrganismos probióticos

(ARAGON-ALEGRO et al., 2007; KAILASAPATHY; SULTANA, 2003; SAARELA et al., 2006).

O sorvete é um alimento com qualidades nutritivas significantes e bem assimiladas pelo organismo (BAOYIFIT et al., 2006), o que faz dele um veículo adequado para a introdução de microrganismos probióticos na dieta humana (ALKIN et al., 2007). Segundo Homayouni et al. (2006) a eficiência da adição de bactérias probióticas em alimentos depende da dose administrada ($\geq 10^6$ UFC/g do produto), do tipo de alimento, da temperatura de estocagem e da presença de oxigênio no produto. Alguns autores têm demonstrado que processos como o congelamento e a incorporação de ar no sorvete podem afetar dramaticamente o número de microrganismos probióticos viáveis presentes durante o tempo de vida-útil do produto (HOMAYOUNI et al. 2006; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997; KAILASAPATHY; SULTANA, 2003).

A proteção física dos probióticos por microencapsulação é a nova aposta para aumentar a sobrevivência destes microrganismos. O processo de microencapsulação ajuda a isolar as células bacterianas dos efeitos do ambiente hostil prevenindo contra uma potencial perda celular (KRASAEKOOPT et al., 2003; MORTAZAVIAN et al., 2006). Assim, a microencapsulação poderia facilitar a fabricação de produtos lácteos probióticos, como o sorvete, contendo bactérias viáveis e estáveis durante todo período de estocagem (PIMENTEL-GONZÁLEZ, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) adicionado em sorvete na forma livre ou microencapsulada, e determinar as características físico-químicas e a aceitabilidade sensorial do produto.

2. Materiais e Métodos

2.1 Preparação da cultura

Cultura pura e liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) (Chr. Hansen, Hønsholm, Dinamarca) foi adicionada, na concentração de aproximadamente $9 \log$ UFC/mL, em uma solução estéril de leite em pó desnatado 12 % (m/v). A solução estoque formada foi mantida a temperatura de -18 ± 2 °C e reativada em estufa a 37 °C, durante 4 horas, antes de ser utilizada

no processo de microencapsulação ou adicionada no sorvete como bactéria livre (não-encapsulada).

2.2 Microencapsulação da bactéria probiótica

Microcápsulas foram preparadas em gel de alginato de sódio 3 % (m/v) (Vetec, MG Química Comercial, Brasil) através da técnica de spray drying. Todos os reagentes e materiais utilizados foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Uma mistura contendo 100 ml da solução estoque de *Lactobacillus acidophilus* em leite em pó desnatado 12 % (m/v) e 250 ml de alginato de sódio foi homogeneizada durante 5 minutos em agitador magnético e submetida à secagem em spray dryer de escala laboratorial (B-290 mini spray dryer, Buchi, Flawil, Suíça). O spray dryer foi operado com temperatura de entrada de ar de 150 °C e temperatura de saída de ar de 50 – 60 °C. O pó de microcápsulas foi coletado na parte inferior do ciclone e imediatamente estocado em recipientes hermeticamente fechados, sob congelamento a -18 ± 2 °C.

2.3 Elaboração dos sorvetes probióticos

Os sorvetes probióticos foram produzidos pela empresa Amoratto Sorvetes Artesanais, localizada na cidade de Florianópolis, estado de Santa Catarina, no sul do Brasil. Duas caldas brancas idênticas foram formuladas separadamente, uma calda foi utilizada para a elaboração do sorvete contendo bactéria probiótica livre e a outra calda para o sorvete contendo bactéria probiótica microencapsulada. Os ingredientes das caldas foram adicionados no pasteurizador durante o processo de aquecimento, sob agitação contínua. As caldas foram pasteurizadas a 80 ± 2 °C por 25 s, resfriadas até 7 ± 2 °C e maturadas a 4 ± 2 °C durante 18 h, sob agitação contínua. No termino da maturação, 2,5 % (m/v) de saborizante e 10 % (v/v) de polpa de morango foram adicionados. As caldas foram homogeneizadas e a bactéria probiótica, livre ou microencapsulada, foi adicionada na concentração de aproximadamente 7,6 log UFC/g de sorvete. As caldas foram então introduzidas na produtora de sorvete onde foram batidas e congeladas a temperatura de -18 ± 2 °C em um processo contínuo. Os sorvetes foram

acondicionados em embalagens plásticas com capacidade de 50 ml e levados para uma câmara frigorífica, com temperatura de $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde continuaram o seu processo de congelamento. Após a fabricação os sorvetes foram mantidos sob temperatura de $-18 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e submetidos a enumeração de células viáveis no primeiro dia de estocagem e semanalmente ao longo de 12 semanas.

2.4 Enumeração de células viáveis

Para determinar o conteúdo de células viáveis no sorvete contendo bactéria livre e no sorvete contendo bactéria microencapsulada, foi utilizado o meio de crescimento ágar MRS (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram realizadas diluições seriadas das amostras em água peptonada 0,1 % (m/v) e estas foram plaqueadas em profundidade utilizando alíquotas de 1 mL. As placas foram incubadas sob anaerobiose a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. Os resultados foram expressos em log de unidade formadora de colônia por grama de sorvete (log UFC/g). A análise foi realizada em triplicata.

Para a liberação das células das microcápsulas o sorvete contendo bactéria microencapsulada foi previamente diluído em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e homogeneizado em agitador magnético durante 15 minutos, de acordo com o método descrito por Sheu e Marshall (1993).

2.5 *Análise físico-química*

Os sorvetes foram analisados quanto à umidade (% m/m), lipídios (% m/m), proteínas (% m/m) e cinzas (% m/m) pela AOAC (2005), e carboidratos totais (% m/m) obtidos por diferença. As medidas dos valores de acidez titulável (% de ácido láctico) foram realizadas conforme o método descrito por Arbuckle (1986) usando hidróxido de sódio 0,1 N e fenolftaleína, enquanto o pH foi determinado em pHmetro (MP220, Metler-Toledo, Greinfensee, Suíça). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6 *Análise sensorial*

Antes da análise sensorial, foi providenciado o parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (Anexo C). A avaliação sensorial foi realizada de acordo com Meilgaard, Civille e Carr (1999), 1 semana após a elaboração dos sorvetes.

Os sorvetes foram submetidos ao teste de aceitabilidade global (Anexo D), com 300 julgadores não treinados e consumidores habituais deste produto, através de uma escala hedônica mista estruturada de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo; 9 = gostei muitíssimo). Além disso, foi avaliada a intenção de compra do produto através de uma escala de 5 pontos (1 = certamente não compraria; 5 = certamente compraria). As amostras foram codificadas e apresentadas aos julgadores monadicamente, em embalagens plásticas de 50 mL, a -18 ± 2 °C.

2.7 *Análise estatística*

A análise dos dados foi realizada no software Statistica versão 6.0 (2001) (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) *one-way* a fim de encontrar diferenças entre as médias, com um nível de significância de 5 %. O teste de Tukey foi utilizado para comparação das médias, quando encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

2.8 Análise de custo

Os custos relativos a adição da cultura probiótica livre ou microencapsulada no sorvete foram calculados a partir da cotação do pacote de cultura pura e liofilizada DVS LA-5, fornecida pela Chr. Hansen Industria e Comércio Ltda., e do rendimento da cultura livre em relação ao processo de microencapsulação por spray drying.

Esta análise de custo não determinou o custo final de produção dos sorvetes uma vez que não foram levados em conta os valores dos ingredientes utilizados na sua elaboração. A formulação básica da calda e as etapas de fabricação do sorvete não são alteradas com a adição da bactéria probiótica, dessa forma um sorvete probiótico pode ser produzido a partir de qualquer calda, com diferentes formulações. Para determinar o custo final do produto, seriam necessários levantamentos quanto a mão-de-obra e os custos indiretos de fabricação.

3. Resultados e Discussão

3.1 Sobrevivência da bactéria probiótica livre e microencapsulada durante a estocagem dos sorvetes

A microencapsulação melhorou significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência da bactéria probiótica, quando comparada com a bactéria livre, após 12 semanas de estocagem dos sorvetes a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$. A viabilidade da bactéria livre diminuiu cerca de 0,35 ciclos log (de $(2,28 \pm 0,03) \times 10^7$ UFC/g para $(1,02 \pm 0,03) \times 10^7$ UFC/g) após 12 semanas de estocagem, enquanto que a bactéria microencapsulada mostrou diminuição de 0,27 ciclos log (de $(2,80 \pm 0,00) \times 10^7$ UFC/g para $(1,50 \pm 0,01) \times 10^7$ UFC/g) (Figura 1).

Resultados semelhantes foram encontrados por Shah e Ravula (2000) que reportaram que a microencapsulação aumentou a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* MJLA1 e *Bifidobacterium spp.* BDBB2 durante 12 semanas de estocagem a -20°C de sobremesas lácteas fermentadas. Sheu e Marshall (1993) mostraram um aumento de 40 % na sobrevivência da bactéria probiótica adicionada em leite congelado quando microencapsulada

em gel de alginato. Segundo Homayouni et al. (2008a) células bacterianas microencapsuladas demoram mais tempo para apresentar uma diminuição substancial da viabilidade quando expostas as condições adversas que ocorrem durante a fabricação dos sorvetes. A microencapsulação protege as células contra lesões provocadas pela tensão mecânica durante a mistura da calda, pela incorporação de ar e pelo processo de congelamento e estocagem do produto (Homayouni et al., 2008b).

Ambos os sorvetes elaborados, adicionados da bactéria probiótica livre ou da bactéria probiótica microencapsulada, foram considerados probióticos, já que apresentaram contagens superiores a 10^6 UFC/g. De acordo com Boylston et al. (2004) e Gomes e Malcata (1999), para ser considerado probiótico o produto deve conter uma concentração de no mínimo 10^6 UFC/g ou mL no momento do consumo.

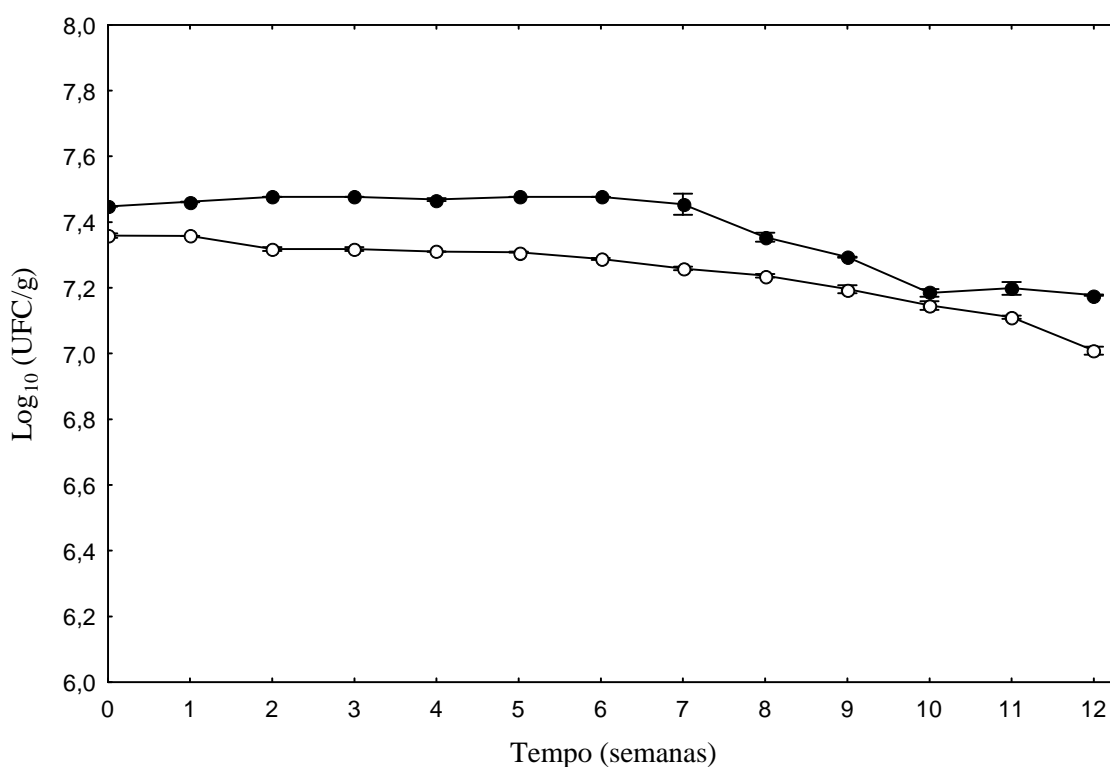


Figura 1. Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) (○) livre e (●) microencapsulado, durante a estocagem dos sorvetes a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$. As barras de erro representam o desvio padrão em relação as médias ($n = 3$). A semana 0 corresponde a contagem de células viáveis (UFC/g) realizada no primeiro dia de estocagem.

3.2 Características físico-químicas

Os valores médios para as características físico-químicas dos sorvetes probióticos estão apresentados na Tabela 1. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de umidade, lipídios, proteínas, carboidratos totais, acidez e pH entre as amostras de sorvete. Essa diferença pode ser justificada pelo fato de que os sorvetes foram elaborados separadamente, a partir da produção de duas caldas brancas (item 2.3). Os ingredientes de cada calda foram pesados em momentos diferentes o que pode ter ocasionado pequenas variações na composição dos produtos.

Ambos os sorvetes atenderam a legislação brasileira que exige que gelados comestíveis a base de leite adicionado de polpa de fruta contenham no mínimo de 2,5 % de lipídios e 2,5 % de proteínas (BRASIL, 1999). Não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham realizado a caracterização físico-química de sorvetes probióticos adicionados de bactérias livres ou microencapsuladas, para que seja feita uma análise comparativa com os resultados obtidos nesse trabalho.

Tabela 1. Caracterização físico-química dos sorvetes probióticos

	Sorvete com <i>Lactobacillus acidophilus</i> livre	Sorvete com <i>Lactobacillus acidophilus</i> microencapsulado
Umidade (% m/m)	66,77 ^a ± 0,36	63,41 ^b ± 0,18
Lipídios (% m/m)	7,28 ^a ± 0,19	7,97 ^b ± 0,09
Proteínas (% m/m)	4,85 ^a ± 0,05	4,74 ^b ± 0,04
Cinzas (% m/m)	0,93 ^a ± 0,14	1,12 ^a ± 0,12
Carboidratos totais (% m/m)	20,15 ^a ± 0,41	22,74 ^b ± 0,19
Acidez (% ácido láctico)	0,53 ^a ± 0,01	0,63 ^b ± 0,02
pH	5,24 ^a ± 0,01	5,11 ^b ± 0,00

* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias.

3.3 Avaliação sensorial

As médias das notas atribuídas pelos julgadores, em relação a aceitabilidade global dos sorvetes, foram 8,32 ($\pm 0,74$) para o sorvete contendo bactéria probiótica livre e 8,21 ($\pm 0,71$) para o sorvete contendo bactéria probiótica microencapsulada. Ambos os sorvetes foram sensorialmente aceitos, pois a média de aceitabilidade ficou acima de 8 (gostei muito), no entanto não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias das notas das amostras, indicando que a microencapsulação da bactéria não interferiu na aceitabilidade dos sorvetes. De acordo com Aryana e Summers (2006), Cruz et al. (2009) e Hekmat e McMahon (1992) a produção de sorvetes probióticos com elevada aceitação sensorial é uma tarefa difícil e requer um grande conhecimento das técnicas de fabricação, quando comparado com os sorvetes convencionais. Fávaro-Trindade et al. (2006) e Hagen e Narvhus (1999) relataram que sorvetes probióticos sensorialmente aceitos pelos consumidores apresentam ausência de “flavour probiótico”, possuindo boa qualidade sensorial.

Com relação à intenção de compra, para o sorvete contendo bactéria probiótica livre, 55 % dos julgadores responderam que certamente comprariam o produto (nota 5 do teste de intenção de compra), 37 % possivelmente comprariam (nota 4) e 9 % talvez comprassem/talvez não comprassem (nota 3). Para o sorvete contendo bactéria probiótica microencapsulada, 54 % dos julgadores certamente comprariam o produto, 40 % possivelmente comprariam e apenas 6 % talvez comprassem/talvez não comprassem. Nenhum julgador respondeu que possivelmente ou certamente não comprariam os sorvetes.

3.4 Custo da adição da bactéria probiótica livre ou microencapsulada no sorvete

Considerou-se para a análise de custo a produção de sorvetes probióticos contendo aproximadamente 10^7 UFC da bactéria probiótica livre ou microencapsulada /g de produto. Essa concentração foi definida com base nos resultados da análise de sobrevivência da bactéria probiótica durante a estocagem dos sorvetes (item 3.1), a fim de garantir uma concentração de células viáveis superior a 10^6 UFC/g ao longo de toda a vida-útil do produto como requerido pela legislação brasileira (BRASIL, 2000). Segundo cotação realizada em 14 de setembro de 2009 o preço de 25 g da cultura pura e liofilizada DVS LA-5 (1 pacote), na concentração de 10^{11} UFC/g, equivale a 51 euros ou 134,62 reais.

Na fabricação dos sorvetes elaborados neste trabalho o batimento de 1L de calda resultou na produção de aproximadamente 2,34 L (1,17 Kg) de sorvete. Esses valores variam

em cada processo dependendo do tempo de batimento e da quantidade de ar incorporado. Portanto para a elaboração do sorvete adicionado de bactéria livre 25 g de cultura foram necessários para a fabricação de 466 L (233 Kg) de sorvete probiótico contendo 10^7 UFC/g. O incremento dado ao custo do litro de sorvete pela adição da cultura probiótica livre correspondeu a:

$$\frac{R\$ 134,62}{466 L} = R\$ 0,29/L$$

Na microencapsulação da bactéria probiótica em spray dryer 25 g de cultura resultaram em cerca de 400 g de microcápsulas secas numa concentração de $1,9 \times 10^8$ UFC/g. Para que o sorvete com bactéria probiótica microencapsulada alcançasse uma concentração de 10^7 UFC/g, 400 g de microcápsulas foram necessários para a fabricação de apenas 14 L (7 Kg) de sorvete probiótico. O custo adicionado ao litro do sorvete pela introdução da cultura probiótica microencapsulada foi de:

$$\frac{R\$ 134,62}{14 L} = R\$ 9,21/L$$

Apesar do custo da adição da bactéria probiótica microencapsulada no sorvete ser bastante elevado em comparação com a adição da bactéria livre, a microencapsulação foi essencial para garantir a sobrevivência das células não só ao longo do tempo de estocagem do produto mas também durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano, resistindo melhor ao meio ácido e as altas concentrações de bile.

Em conclusão, a microencapsulação melhorou a viabilidade da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* (La-5) durante a estocagem dos sorvetes, porém não influenciou a aceitabilidade sensorial do produto. Os sorvetes probióticos foram sensorialmente aceitos pelos julgadores que afirmaram que possivelmente ou certamente comprariam o produto. Além disso, o sorvete mostrou ser um bom veículo para a ingestão de bactérias probióticas, já que o conteúdo de células viáveis, tanto livres quanto microencapsuladas, permaneceu superior a 10^6 UFC/g ao longo de todo período de realização do trabalho. Um estudo de otimização do método de microencapsulação por spray dryer seria uma alternativa para

melhorar o rendimento e diminuir os custos de produção do sorvete probiótico adicionado de células microencapsuladas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a empresa Amoratto Sorvetes Artesanais.

Referências bibliográficas

AKIN, M.B., AKIN, M.S., KIRMACI, Z. Effectsof inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v. 104, p. 93 – 99, 2007.

ALMEIDA, M.H.B. de, ZOELLNER, S., CRUZ, A., MOURA, M.R.L., FREITAS, M.C.J., SANT'ANA, A. Potentially probiotic açai yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 2, p. 178 – 182, 2008.

ARAGON-ALEGRO, L.C., ALARCON-ALEGRO, J.H., CARDARELLI, H.R., CHIU, M.C., SAAD, S.M.I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, p. 669 – 675, 2007.

ARBUCKLE, W. S. **Ice Cream**. 14 ed. Westport: Avia Publishing Company. New York : Van Nostrand Reinhold, 1986. 483 p.

ARYANA, K. J., SUMMERS, M. Probiotic fat-free, no sugar added ice-cream. **Milchwissenschaft**, v. 61, n. 1, p. 184–187, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18th. Edition. Maryland, USA, 2005.

BAOYIFIT, G., KULEAOAN, H., KARAHAN, A.G. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 796 – 800, 2006.

BOYLSTON, T.D., VINDEROLA, C.G., GHODDUSI, H.B., REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 375–387, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 379, de 26 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico referente a gelados comestíveis, preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.anvisa.org.br>>. Acesso em: 07 de maio de 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 de maio de 1999. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 06 novembro 2008.

CRUZ, A. G., ANTUNES, A. E. C., SOUSA, A. L. O. P., FARIA, J. A. F., SAAD, S. M. I. Review: Ice-cream as a probiotic food Carrier. **Food Research International**, In Press 2009.

FAVARO-TRINDADE C.S., BERNARDI, S., BODINI R.B., BALIEIRO J.C.C., ALMEIDA E. Sensory acceptability and stability of probiotic microorganisms and vitamin C in fermented acerola (*Malpighia emarginata* DC.) ice cream. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 492–495, 2006.

FÁVARO-TRINDADE, C.S., PINHO, S.C., ROCHA, G.A. Review: Microencapsulation of food ingredients. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103 – 112, 2008.

GODWARD, G., KAILASAPATHY, K. Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in ice cream. **Milchwissenschaft**, v. 58, n. 3-4, p.161 – 164, 2003.

GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, n. 4/5, p.139-157, 1999.

HAGEN M., NARVHUS A.. Production of ice cream containing probiotic bacteria. **Milchwissenschaft**, v. 54, p. 265–268, 1999.

HEKMAT S., MCMAHON D.J. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1415–1422, 1992.

HOMAYOUNI, A., AZIZI, A., EHSANI, M.R., YARMAND, M.S., RAZAVI, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, p. 50 – 55, 2008a.

HOMAYOUNI, A., EHSANI, M. R., AZIZI, A., RAZAVI, S. H., YARMAND, M. S. Spectrophotometrically evaluation of probiotic growth in liquid media. **Asian Journal of Chemistry**, v. 20, n.3, p. 2414–2420, 2008b.

HOMAYOUNI, A.; EHSANI, M. R.; AZIZI, A.; YARMAND, M. S.; RAZAVI, S. H. A review on the method of increasing probiotic survival in functional dairy foods. **In: Proceedings of the 9th Iranian nutrition congress**, p. 288 – 297, 2006.

KAILASAPATHY, K., SULTANA, K. Survival and β -D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice cream. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 3, p. 223 – 227, 2003.

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* – their therapeutic potential and survival in yoghurt. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 52, p. 28-35, 1997.

KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B., DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 3-13, 2003.

MEILGAARD, M., CIVILLE, G.V., CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 3 ed., Boca Raton, FL.: CRC Press, 1999. 387p.

MORTAZAVIAN, A., RAZAVI, S. H., EHSANI, M. R., SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1-18, 2007.

ONG, L., HENRIKSSON, A., SHAH, N.P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v.16, p. 446 – 456, 2006.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.J., CAMPOS-MONTIEL, R.G., LOBATO-CALLEROS, C., PEDROZA-ISLAS, R., VERNON-CARTER, E.J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 42, p. 292 – 297, 2009.

SAARELA, M., VIRKAJÄRVIA, I., ALAKOMI, H-L., SIGVART-MATTILA, P., MÄTTÖ, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p.1477 – 1482, 2006.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v.61, p. 91 – 99, 2003.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1262–1277, 2007.

SHAH, N.P., RAVULA, R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Australian Journal Dairy Technology**, v.55, p.139-144, 2000.

SHEU, T. Y., MARSHALL, R. T. Micro-encapsulation of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. **Journal Food Science**, v.54, n.3, p.557-561, 1993.

VRESE, M. de, SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics and synbiotics. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.111, p.1–66, 2008.

CONCLUSÕES

- O presente estudo mostrou que a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) em gel de alginato, por emulsificação ou por spray drying, é capaz de melhorar a sobrevivência da bactéria probiótica durante 12 semanas de estocagem em baixa temperatura.
- Em meio ácido e em concentrações de sais de bile as microcápsulas produzidas por spray drying foram mais resistentes do que as microcápsulas produzidas por emulsificação, melhorando a sobrevivência da bactéria probiótica quando exposta a condições gastrointestinais humanas.
- A técnica de microencapsulação por spray drying foi considerada mais eficiente e segura para incorporação de bactérias probióticas em novos produtos lácteos.
- Na fabricação de sorvetes probióticos a microencapsulação melhorou a viabilidade da bactéria, durante 12 semanas de estocagem do produto a $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Os sorvetes elaborados com a bactéria probiótica livre ou com a bactéria probiótica microencapsulada apresentaram características físico-químicas distintas, porém dentro das exigências estabelecidas pela legislação.
- Quanto a avaliação sensorial, a microencapsulação não influenciou na aceitabilidade do sorvete. Os dois tipos de sorvete foram sensorialmente aceitos pelos julgadores que afirmaram que possivelmente ou certamente comprariam o produto.
- Além disso, o sorvete mostrou ser um bom veículo para a ingestão de bactérias probióticas, já que o conteúdo de células viáveis, tanto livres quanto microencapsuladas, permaneceu superior a 10^6 UFC/g ao longo de todo período do estudo.

ANEXOS

**ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da
UFSC**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos

CERTIFICADO **Nº 142**

O Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

APROVADO

PROCESSO: 169/08 FR- 200940

TÍTULO: Influência da microencapsulação na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e nas características físico-químicas de sorvetes.

AUTORES: Ernani Sebastião Sant'Anna e Juliana Goulart Lorenz.

DPTO.: CCA.

FLORIANÓPOLIS, 28 de julho de 2008.

Coordenador do CEPSH/UFSC - Prof.º Washington Portela de Souza

ANEXO B – Ficha para avaliação sensorial dos testes de aceitabilidade global e intenção de compra

TESTE DE ACEITABILIDADE – ESCALA HEDÔNICA

Nome: _____ Data: _____

Amostra: _____

Prove a amostra de sorvete de morango e avalie o quanto você gostou ou desgostou usando a escala abaixo.

- 9 – Gostei muitíssimo
- 8 – Gostei muito
- 7 – Gostei moderadamente
- 6 – Gostei levemente
- 5 – Indiferente
- 4 – Desgostei levemente
- 3 – Desgostei moderadamente
- 2 – Desgostei muito
- 1 – Desgostei muitíssimo

Nota: _____

TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA

Se você encontrasse este sorvete a venda, você:

- (5) certamente compraria
- (4) possivelmente compraria
- (3) talvez comprasse/ talvez na comprasse
- (2) possivelmente não compraria
- (1) certamente não compraria

Obrigada!